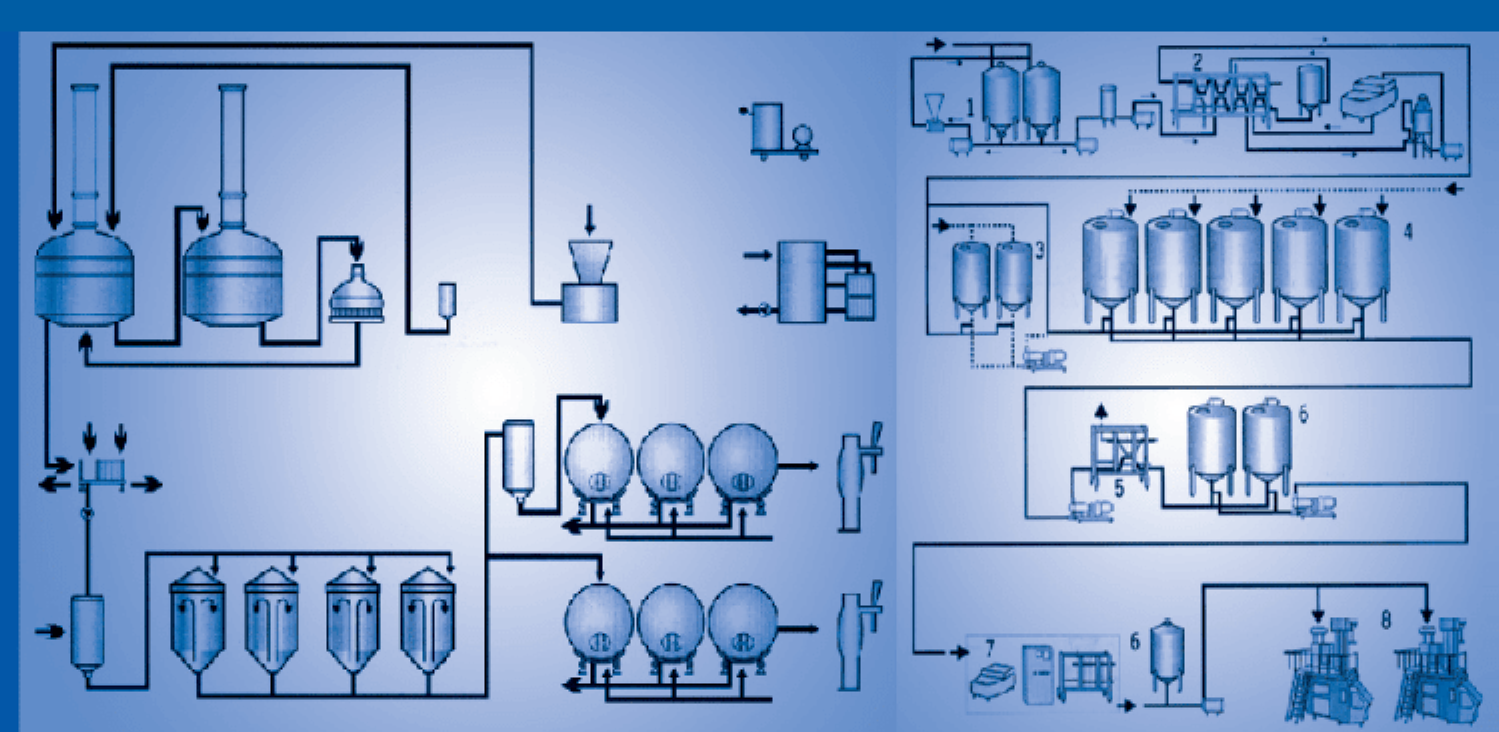


主　编　　曹竹安　陈　坚
副主编　　高海军　陈金春

Bioreaction Engineering Principles





生物反应工程原理

清華大學出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物反应工程原理

主　编　曹竹安　陈　坚
副主编　高海军　陈金春

清华大学出版社
北　京

内 容 简 介

生物反应工程是连接生命科学基础研究与工程应用的桥梁，在生物技术产业化过程中的作用举足轻重。全书按照生物反应动力学及定量分析、生物反应器与生物反应过程设计、生物反应工程应用的思路组织，既考虑了教材的基础性和系统性，又考虑了内容的先进性，使读者尽可能全面地掌握生物反应工程的基本概念、基本原理，以及近年来生物反应工程学科的最新进展。全书共分 10 章，每章均包含大量的实例，并附有习题，有利于学生加深对基本概念和原理的理解，巩固各章的知识。本书可作为高等院校生物工程、生物技术专业教材。

版权所有，侵权必究。侵权举报电话：010－62782989　13701121933

图书在版编目（CIP）数据

生物反应工程原理 / 曹竹安，陈坚主编. --北京：清华大学出版社，2011. 5
ISBN 978－7－302－24548－3

Ⅰ. ①生…　Ⅱ. ①曹…　②陈…　Ⅲ. ①生物工程：化学工程　Ⅳ. ①Q81　②Q939. 97

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2011）第 009306 号

责任编辑： 罗　健
责任校对： 赵丽敏
责任印制：

出版发行： 清华大学出版社　　**地　　址：** 北京清华大学学研大厦 A 座
http：//www. tup. com. cn　　**邮　　编：** 100084
社　　总　　机： 010－62770175　　**邮　　购：** 010－62786544
投稿与读者服务： 010－62776969，c-service@ tup. tsinghua. edu. cn
质　量　反　馈： 010－62772015，zhiliang@ tup. tsinghua. edu. cn
印 刷 者：
装 订 者：
经　　销： 全国新华书店
开　　本： 185×260　　**印　张：** 27. 5　　**字　　数：** 698 千字
版　　次： 2011 年 5 月第 1 版　　**印　　次：** 2011 年 5 月第 1 次印刷
印　　数： 1～3000
定　　价： 49. 80 元

产品编号：



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

《生物反应工程原理》编委会

主　编　曹竹安　陈　坚

副主编　高海军　陈金春

编　者　(以姓氏汉语拼音为序)

曹竹安　清华大学
陈　坚　江南大学
陈金春　清华大学
陈晶瑜　中国农业大学
堵国成　江南大学
高海军　北京理工大学
李　春　北京理工大学
刘　龙　江南大学
徐小琳　新疆石河子大学
易丽娟　新疆石河子大学
于慧敏　清华大学
袁其朋　北京化工大学
张延平　中国科学院微生物研究所
周　延　北京化工大学

前　　言

生物技术有很长的发展历史了，但与生物过程、生物催化转化相关的知识体系却远未成熟。分子生物学与基因工程，特别是近年来组学技术的发展，极大地扩展和深化了以生物反应过程的定量分析与设计为基础的生物反应工程学科知识体系。酶或细胞催化转化的机制，不同类型生物反应器和生物反应过程的分析与设计，细胞代谢网络的分析与调控等相关的新理论、新技术的不断出现，丰富和充实了生物反应工程的研究内容。生物反应工程在工业生物技术、医药生物技术、环境生物技术等生命科学研究与应用领域发挥越来越重要的作用。

本书内容主要分为 3 部分：第 1 部分为生物反应定量分析基础，主要介绍了生物反应动力学、细胞内反应及代谢网络分析基础，该部分内容也是生物反应工程学科的基础；第 2 部分为生物反应过程分析与设计原理，论述了生物反应器及其原理、生物过程设计原理，该部分内容是生物反应工程的核心内容；第 3 部分为生物反应工程的应用，主要介绍了重组微生物过程、动植物细胞过程及相关动力学与反应器，该部分内容是生物反应工程在现代生物技术中的具体应用。每一部分均含不同的章节，包含大量的实例，章后附有习题，用于加深学生对基本概念和原理的理解，巩固各章的知识。

第 1 章绪论，概要介绍了生物反应工程的重要性、主要研究内容以及发展趋势。

第 2 章酶反应动力学，概述了酶反应机制，以酶反应速率为重点，介绍了均相酶反应动力学、固定化酶反应动力学，并对非水相酶催化反应、辅助因子工程等相关研究进行了较为系统的总结。

第 3 章微生物反应质能平衡与计量，通过黑箱模型建立了微生物反应过程的质量和能量平衡关系，引入一些重要的量化微生物反应过程的概念，是分析以细胞为基础的生物反应过程、建立反应动力学模型和进行过程设计的基础。

第 4 章代谢网络及其分析、设计基础，简要总结了有关代谢网络调控及代谢工程新技术的最新进展，尤其是基于组学（基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢物组学、代谢通量组学等）和全局观点的代谢网络调控及代谢工程研究，介绍代谢网络分析、代谢通量分析方法，并通过具体实例讨论了代谢工程在微生物法生产化学品、动物细胞培养过程中的应用。

第 5 章微生物反应动力学，在了解微生物生长、代谢过程基本规律的基础上，围绕微生物过程的速率问题，介绍了微生物生长过程（包括固态发酵）中细胞生长、底物消耗和产物形成的非结构模型，以及高温灭菌、过滤除菌动力学。该章内容是微生物过程的定量分析和设计的关键。

第 6 章生物反应过程的传递，主要介绍了生物反应过程中的传递（特别是气液传递）的相关概念和原理，主要包括生物反应体系的流变学特性，生物反应体系中的流体流动模型，生物反应器中的搅拌与混合，气液传质动力学与体积传质系数的测定，热量传递等内

容。该章内容对深入了解生物反应过程具有重要意义。

第 7 章生物反应器工程，介绍生物反应器的概念、分类与设计基础等相关知识，对几种典型的生物反应器（机械搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、膜生物反应器和管式生物反应器）的结构特点、操作特性及其应用进行了归纳和总结，并对生物反应器的过程控制及放大原则与步骤进行了阐述。

第 8 章发酵过程设计，以发酵过程的操作方式为重点，介绍了生物反应器选择的原则以及分批、连续和流加反应过程中微生物生长代谢规律及过程设计要点。生物反应器的选择与过程设计是生物工程（尤其是生物反应工程）的中心问题。

第 9 章重组微生物反应工程，介绍了重组微生物培养过程的动力学特点，结合具体实例介绍重组微生物过程的关键技术。

第 10 章动、植物细胞反应工程，介绍了动、植物细胞培养过程的动力学特点、培养关键技术、反应器，并对其应用领域做了概述。

本书可作为生物工程、生物技术类本科专业基础课教材，也可供相关专业研究生和科研人员选用。在编写过程中，编写人员除考虑了教材的基础性和系统性外，还适当考虑了内容的先进性和知识结构的合理性，在相关章节介绍了近年来生物反应工程学科研究的最新进展。本书参考了大量同行专家的教材、著作和文献，在此表示衷心的感谢。尽管参加本书编写的所有作者为写好本书付出了大量艰辛的努力，但由于编写水平有限，书中缺点和错误在所难免，恳请同行专家、使用本教材的师生和其他读者批评指正。

编　者

2011 年 5 月于北京

目　　录

第 1 章　绪　　论

【重要概念】

生物过程、生物反应动力学、生物反应器、发酵过程、酶催化过程

引言

生物技术是一门将现代生物科学技术成果应用于大规模生产，以满足人类能源、材料和化学品需求的技术。人们可以采用生物质原料来替代石油和天然气，或采用生物学工艺过程（如发酵或生物催化）来替代化学工艺过程，其最终目的是生产出性质与现有化学品相同的产品，或者是具有新性能的产品。能源的短缺、资源的匮乏、环境治理的需求，促使工业生物技术正在成为继医药生物技术和农业生物技术以后生物技术发展的“第三次浪潮”。

生物反应工程是生物技术成果产业化的基础。生物反应工程相关理论的逐步完善，使得生物过程的建立逐步摆脱传统（依靠经验）的时代。同时，随着生命科学的飞速发展，新的理论和技术不断涌现，生物反应工程所涵盖的内容也在不断扩展，不同学科结合更加紧密。本章概要性地介绍了生物反应工程的重要性、主要研究内容以及发展趋势。

1.1　生物反应工程是生物技术产业化的桥梁

工业生物技术主要通过生物过程来实现，其实质是利用生物催化剂进行生物技术产品的生产过程，其开发和运行过程如图 1-1 所示。当过程采用游离的整体微生物活细胞为生物催化剂时，一般称此为发酵过程（特定情况下也可称为微生物培养过程、微生物转化过程等），而当生物催化剂为游离或固定化酶时，此过程则称为酶反应过程。

生物反应过程具有下列特点：①由于采用生物催化剂，反应过程可在常温、常压下进行，且可运用 DNA 重组技术及原生质体融合等现代生物技术构建或改造生物催化剂而赋予生物反应过程以现实和潜在的活力，但生物催化剂易于失活、易受环境的影响和杂菌的污染，一般不能长时间使用。②采用可再生资源（来源丰富、价格低廉）为主要原材料，过程中废物的危害性较小，但原料成分往往难以控制，给产品质量带来一定影响。③与化工生产相比，生产设备较为简单，能量消耗一般也较少，但由于过高的底物或产物浓度常导致酶的抑制或细胞不能耐受如此高的渗透压而失活，因此反应液中的底物（基质）浓度不能过高，这样会导致很大的反应器体积且要求在无杂菌污染情况下进行操作。④酶反应过程的专一性强，转化率高，但成本较高，发酵过程成本低、应用广，但反应机制复杂，较难控制，反应液中杂质较多，给提取纯化带来困难。

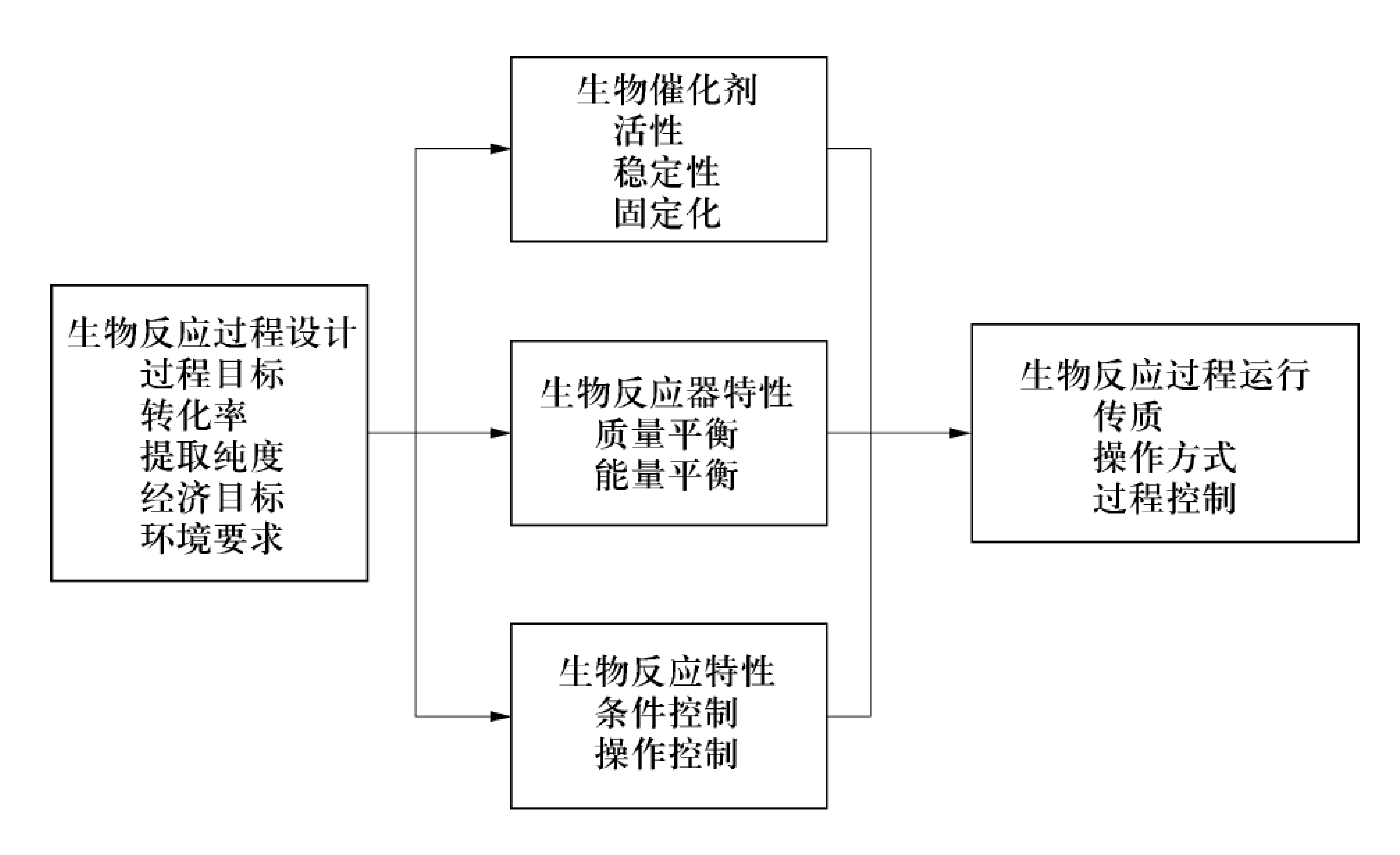


图 1-1　生物过程技术开发与运行示意图

与化工工程类似，生物过程的设计和开发首先需要解决以下几个问题。

(1) 生物过程将会如何变化：要回答这个问题，首先要对生物过程所包含的科学基础（包括微生物学、生物化学、分子生物学、遗传学等）有足够的了解。好的生物催化剂是生物过程的起点。高通量筛选和平行实验技术使得寻找一种能完成特定反应的生物催化剂变得更加容易，定向进化与基因重组技术在新生物催化剂的筛选中也担当了重要的角色。定向进化通过诱变产生变异体，利用基因改组方法（gene shuffling）重组若干个基因。不用引入额外的突变，只需进行不同的重组，就可以在较短的时间内开拓出一个更为广大的序列空间，但仅有生物催化剂还远远不够。

(2) 生物过程进行的速率如何：一旦确定采用特定的生物催化剂生产产品，下一步就需要知道过程进行的速率。生物反应动力学主要研究生物反应过程的速率及对其产生影响的物理或化学因素。生物反应器是生物反应进行的场所，影响生物过程的多种物理条件。反应采用整体微生物细胞的反应器则称发酵罐；凡采用酶催化剂的反应器则称为酶反应器。另外，还有适用于动、植物细胞大量培养的装置。不同的操作条件对生物催化速率有很大影响，如热力学、传质、生物相互作用、菌种稳定性等。

(3) 如何操作和控制生物反应系统以获得最大转化效率：这涉及可靠的在线传感器、在线优化算法（on-line optimization algorithm）及相应的控制策略，这些因素可提高生物反应器系统的可操作性，保证生物过程的最经济运行。

(4) 如何以最低成本分离、纯化得到高纯度产品：这一部分常称为下游加工，是生物化学分离工程的主要内容。在生物产品分离、纯化操作中，标准的化工单元操作起着重要的作用，如蒸馏、吸附、干燥、过滤、沉淀等，除此以外还包括一些目前处于实验室规模的新技术，如层析、电泳、透析等。

1.2　生物反应工程的主要研究内容

生物反应工程是一门以生物反应动力学为基础，以生物反应器为核心，研究生物过程基本规律的学科。生物反应工程的主要研究内容可分为生物反应动力学、生物反应器和生物反应过程的放大和缩小等几个部分。

1.2.1　生物反应动力学

生物反应动力学主要研究生物反应速率（主要是微生物发酵反应、酶催化反应）及各种因素对生物反应速率的影响。生物催化剂的性能是决定速率大小的主要因素，而理化条件则会直接或间接地影响速率。应当指出，微生物反应动力学研究的对象既然是运动着的物质，就不能单纯地用传统的静态变量如质量、溶氧、菌体量等进行描述，而必须涉及许多动态变量，如细胞生长比速率、基质消耗比速率、CO_2 生成比速率、产物生成比速率等。这些动态变量一般不能直接测量，只能根据动力学方程式间接估计。

微生物过程的传统控制方法，是凭经验对一些静态变量（如 pH、溶氧、残余基质浓度等）按设定点进行孤立控制，没有系统考虑各变量之间的内在联系，也未能反映发酵过程的动态特性，因而带有很大的局限性和盲目性。例如，pH 的控制可用加入酸、碱或者增加培养基中的缓冲成分方法，或者用调节各种基质的补加率来维持生理酸、碱性物质的代谢平衡的方法，但可能会出现截然不同的结果。又如，为了维持某一水平的基质浓度，采用高水平的碳、氮平衡补料或低水平的碳、氮平衡补料，必然产生大相径庭的结果。还有，以高菌体浓度、低生长速率或低菌体浓度、高生长速率达到同一溶氧水平，结果也大不相同。

要对微生物过程进行优化控制，必须了解达到高产所必须具备的生产菌株生长状态（生长速率、形态、浓度等），相应的基质和氧的需要率，以及各种微生物培养条件对这种生长状态和需要量的影响。由于微生物发酵动力学主要研究微生物生长速率、基质和氧消耗速率、产物生成速率等动态变量之间的关系以及它们与发酵条件之间的关系，因而掌握这些关系，就能更加系统、有效地驾驭这些发酵条件和动态变量，发酵过程的控制问题也就迎刃而解了。

按微生物过程动力学原理对发酵过程进行优化控制，涉及许多数据的采集、处理、综合、运算和参数估计，并要求具有实时性，这对于常规检测和控制手段来说是不可能做到的，必须采用在线检测技术和过程控制计算技术。反过来，实施计算机系统对发酵过程的参数估计与动态优化控制，也必须以能够描述各变量变化速率之间关系的动力学方程（即数学模型）为基础。

例如，发酵动力学研究的动态变量介绍如下所述：

菌体生长比速率
$$\mu = \frac{\mathrm{d}c_X}{c_X \mathrm{d}t} \tag{1-1}$$

基质消耗比速率
$$q_S = -\frac{\mathrm{d}c_S}{c_X \mathrm{d}t} \tag{1-2}$$

产物生成比速率
$$q_P = \frac{\mathrm{d}c_P}{c_X \mathrm{d}t} \tag{1-3}$$

O_2 消耗比速率
$$q_{O_2} = -\frac{\mathrm{d}c_{O_2}}{c_X \mathrm{d}t} \tag{1-4}$$

CO_2 生成比速率
$$q_{CO_2} = \frac{\mathrm{d}c_{CO_2}}{c_X \mathrm{d}t} \tag{1-5}$$

式中：c_X 表示菌体浓度（菌体量通常以菌体干重表示）；c_S 表示基质浓度；c_P 表示产物浓度；c_{O_2}表示 O_2 浓度；c_{CO_2}表示 CO_2 浓度。

1.2.2 生物反应器及相关技术

生物反应器（bioreactor）是生物技术转化为产品、生产力的关键设备，其在生物过程中处于中心地位。生物化工领域使用的生物反应器是利用酶或微生物体所具有的生物功能进行生化反应的装置系统，是一种生物功能模拟机，如发酵罐、固定化酶或固定化细胞反应器等。使用高效率生物反应器的目的是提高产品生成速率，减少辅助设备，降低生产成本，获得尽可能大的经济效益。

常见的生物反应器除了发酵罐以外，与酶应用相关的固定化酶反应器也备受关注。固定化酶的研究始于1910年，20世纪60年代、70年代已在全世界普遍开展。酶的固定化（immobilization of enzyme）是用固体材料将酶束缚或限制在一定区域内，仍能进行其特有的催化反应并可回收及重复利用的一类技术。与游离酶相比，固定化酶在保持其高效专一及温和的酶催化反应特性的同时，又克服了游离酶的不足之处，呈现储存稳定性高、分离回收容易、可多次重复使用、操作连续可控、工艺简便等一系列优点。固定化酶研究不仅在化学、生物学及生物工程、医学等学科领域异常活跃，得到迅速发展和广泛应用，而且具有节省资源与能源、减少或防治污染的生态环境效应的优点，符合可持续发展的战略要求。近年来，在固定化酶广泛应用的基础上，人们发现天然细胞本身就具有多功能的系列化反应系统，采用物理或化学方法将细胞固定化是利用酶或酶系的一条捷径。一个固定化细胞反应器犹如一台“生命活动功能推动机”。固定化细胞技术开始于20世纪70年代，其实际应用程度已超过固定化酶。美国、欧洲各国、日本均采用固定化酶体柱床工艺大规模生产高果糖浆。

1.2.3 生物反应过程的放大

一个生物工艺过程的开发总是先从实验室规模开始的，然后经小试、中试、生产性试验几个阶段才可真正进行工业化规模生产，这就是生物反应过程的放大。工业生物反应器中总存在一定程度的物料返混，并且生物反应器体积越大，返混越严重。因此生物反应过程放大时，不能将实验室研究的反应动力学参数简单地照搬到工业生产，而要采用适宜的放大方法。工业生产中出现了问题，不可能简单地在生产上使用工业生物反应器进行研究，因为研究成本太昂贵了，而应在实验室中使用小型生物反应器来模拟生产过程进行研究，这就是生物反应过程的缩小。无论是放大，还是缩小，都需要生物反应工程理论的指导。一般的生物反应器放大方法包括经验放大法、数学模拟放大法和涉及因次分析和时间常数的分析放大法等。

1.3 生物反应工程的发展趋势

1.3.1 从微观角度揭示细胞内反应过程规律

代谢处于生命活动调控的末端，是驱动生命过程的化学引擎，产生能量来驱动各种细胞过程，降解和合成许多不同的分子。代谢网络把细胞内所有生化反应表示为一个网络，反映了所有参与代谢过程的化合物之间以及所有催化酶之间的相互作用，是对细胞代谢的抽象表达。尽管不同的物种有大量的代谢反应，代谢网络却是高度保守的。近几年来，随着数百种生物的全基因组测序的完成以及基因组注释信息的日益完善，使得可以依赖基因组信息较为

可靠地重建物种特异的代谢网络，因此，预测代谢网络的功能成为后基因组时代的基本任务之一。对代谢网络开展研究，以量化的方式了解代谢网络的动力学性能，如通量分布、代谢控制变量、代谢节点刚性等，有助于更好地认识和利用细胞代谢过程，对特定条件下细胞代谢性能进行预测，从而开展代谢途径改造，增强细胞某一特定表型。

1.3.2　在基础生物学研究中发挥重要作用

生物反应工程不仅在生物过程设计中至关重要，在相关基础研究中也发挥重要的作用。目前有很多物种的基因组已经完全测序，确定基因功能（功能基因组学）、了解细胞内系统各组成元件如何作用已经是后基因组学研究的主要内容之一。系统生物学整合基因组、转录组、代谢组等组学数据，建立整体层次上的数学模型，在整体上描述生物反应过程及其调控机制，试图阐明生物体内各种要素之间相互作用及其动力学过程。系统生物学基本研究思路主要是获取数据、建立模型、实验验证、修改模型、再次实验验证，如图 1-2 所示。随着这个过程的进行，人们对生命活动规律的认识不断深入，实验技术和方法也不断发展。可以预见，未来的基础研究创新和过程设计开发之间的距离会越来越短，生化过程研究人员将在不同的研究领域中起到重要的作用。

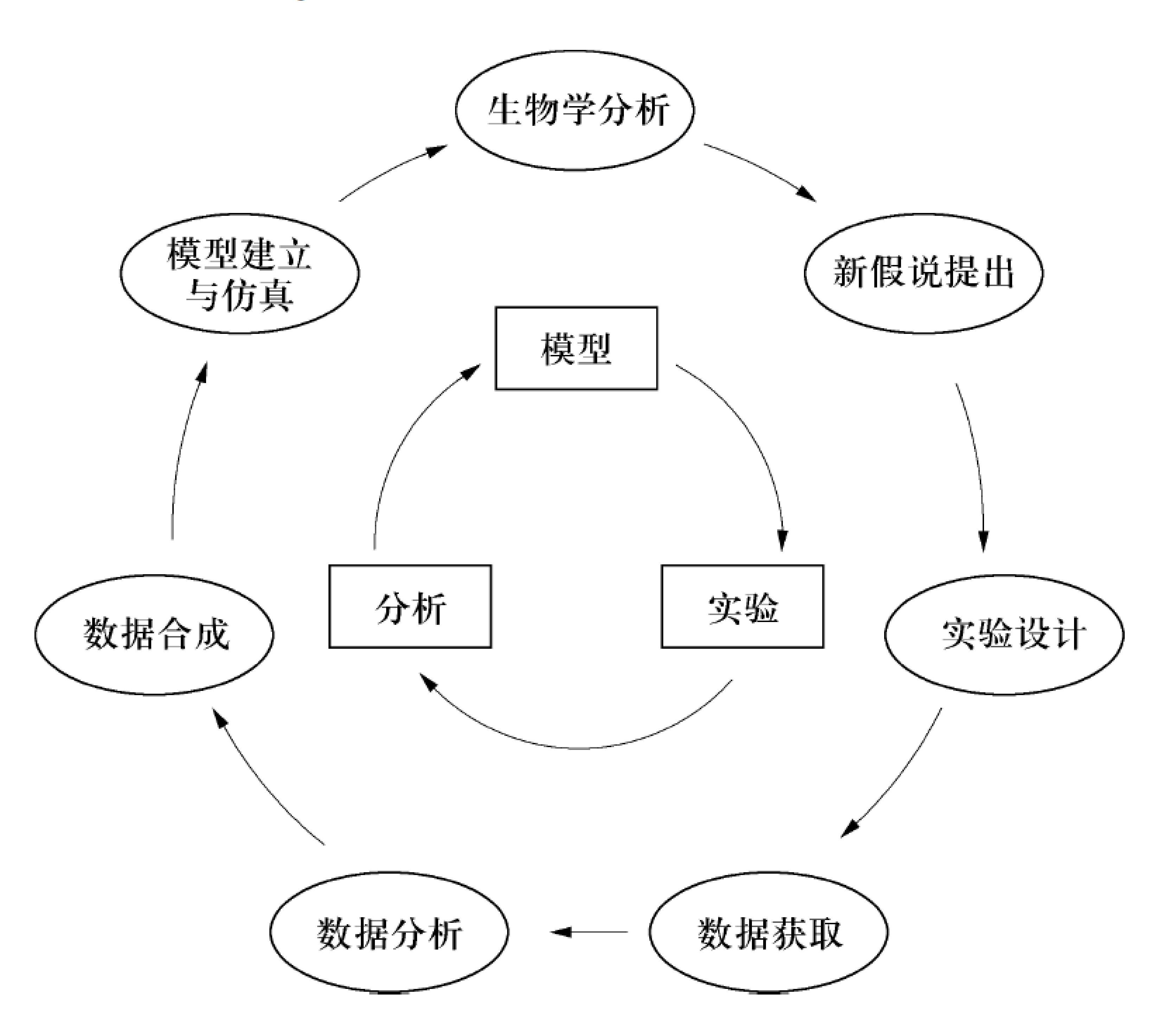


图 1-2　系统生物学研究示意图

1.3.3　揭示重组微生物与动、植物细胞等新型催化剂的生物过程规律

随着基因重组技术的发展，越来越多的外源基因在微生物中表达，为大量生产异源蛋白或改变微生物固有的代谢特性以提高初级或次级代谢产物的生产能力创造了条件。重组微生物的应用已经使现代发酵工业的产品范围大大拓宽，食品工业产品如饮料、醋酸和面包等，医药工业产品如胰岛素、干扰素、生长激素、抗生素和疫苗等，应用于农业中的产品如天然杀虫剂、细菌肥料和微生物除草剂等，化学工业产品如氨基酸、香料、生物高分子、酶、维生素和单细胞蛋白等，能源工业产品如燃料乙醇、丁醇等。利用基因重组技术构建的工程菌的工艺过程不同于传统的发酵工艺。就其操作对象而言，前者含有带外源基因的重组载体，

而后者是单一的微生物细胞，它们会在生长代谢的诸多方面表现出不同；从工艺过程考虑，工程菌的发酵生产目的是通过基因表达或是获得蛋白质或是由于微生物新的基因型所产生的表型变化——合成新的代谢产物。外源基因的高水平表达，新代谢产物的大量合成，不仅涉及宿主、载体和克隆基因三者之间的相互关系，而且与其所处的环境条件息息相关，因此，仅按传统的发酵工艺生产生物制品是远远不够的。采用生物反应工程技术方法研究重组微生物的生长、代谢动力学规律，进行生物反应器的改造和生物过程的设计，提高菌株生长密度，强化外源基因高效表达，提高合成效率，降低分离费用，同时还可缩短生产周期、减少设备投资，从而达到降低成本、提高生产效率的目的。

利用动物细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗、抗体、代谢产物等，已成为医药生物高技术产业的重要组成。动物细胞生物过程有许多有别于微生物过程的技术。动物细胞虽可像微生物细胞一样，在人工控制条件的生物反应器中进行大规模培养，但其细胞结构和培养特性与微生物细胞相比，有显著差别：①动物细胞比微生物细胞大得多，无细胞壁，机械强度低，对剪切应力敏感，适应环境能力差；②倍增时间长，生长缓慢，易受微生物污染，培养时须用抗生素；③培养过程需氧量少（氧传质系数 k_La 大于 $10h^{-1}$ 即可满足每毫升 10^7 个细胞的生长）；④培养过程中细胞相互粘连以集群形式存在；⑤原代培养细胞一般繁殖 50 代即退化死亡；⑥代谢产物具有生物活性，生产成本高，但附加值也高。高等生物细胞的生物过程是个复杂的系统工程，涉及营养、传递、固定化技术、反应器技术等。与微生物反应器相比，动物细胞反应器主要解决的问题是要按照动物细胞的生长要求，使反应器具备低的剪切效应、良好的传递效果和流体力学性质。但在实际过程中，这些原则总有一些相互制约的因素，为了强化传递效果需要有一个充分的混合环境（包括气体鼓泡），但动物细胞的脆弱性制约了这个环境的形成；为提高培养介质中的溶氧度需要有较高的氧分压，不过，高的氧分压也影响了代谢产物的移出。如何平衡这些制约动物细胞生长代谢的因素，是这类反应器开发中要解决的问题。

本章小结

生物反应工程在生物技术产业化过程中起着重要的作用。通过对生物反应动力学、微生物和酶反应器等的研究，了解生物过程变化的机制，指导生物过程的设计。在生命科学飞速发展的今天，该学科不仅应用于工程设计，还与基础科学（如系统生物学等）交叉融合，促进了生命科学的发展。

参考文献

岑沛霖. 2005. 生物反应工程. 北京：高等教育出版社

贾士儒. 2003. 生物反应工程原理. 第 2 版. 北京：科学出版社

李寅，高海军，陈坚. 2006. 高细胞密度发酵技术. 北京：化学工业出版社

山根恒夫. 2006. 生物反应工程. 第 3 版. 邢新会译. 北京：化学工业出版社

赵静. 2008. 细胞代谢网络的结构、功能与进化研究：［学位论文］. 上海：上海交通大学图书馆

Beloqui A, Dominguez de Maria P, Golyshin P N, et al. 2008. Recent trends in industrial microbiology. Current Opinion in Microbiology, 11: 240 ~ 248.

Das S, Rosazza J P N. 2006. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. Journal of Nat-

ural Product, 69: 499 ~ 508

Dunn I J, Heinzle E, Ingham J, et al. 2003. Biological Reaction Engineering. Second Edition. Weinheitn: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Dutta R. 2008. Fundamentals of Biochemical Engineering. New York: Springer Berlin Heidelberg

Gadler P, Faber K. 2007. New enzymes for biotransformations: microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. Trends in Biotechnology, 25 (2): 83 ~ 88

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G. 2003. Bioreaction Engineering Principles. Second Edition. New York: Kluwer Academic/plenum Publisher

Turner N J. 2004. Enzyme catalysed deracemization and dynamic kinetic resolution reactions. Current Opinion in Chemical Biology, 8: 114 ~ 119

Wandrey C, Liese A, Kihumbu D. 2000. Industrial biocatalysis: past, present, and future. Organic Process Research & Development, 4: 286 ~ 290

习　　题

1. 生物反应工程如何在生物技术成果产业化过程中起作用?
2. 生物反应工程的主要研究对象和研究内容有哪些?

第 2 章　酶反应动力学

【重要概念】

酶反应动力学、米氏常数、固定化酶、非水相催化、辅助因子

引言

酶是一种具有特殊催化能力的生物催化剂，细胞新陈代谢所包括的化学反应几乎都是在酶的催化下进行的，没有酶的参与，新陈代谢只能以极其缓慢的速度进行，生命活动就根本无法维持。近年来，酶催化反应已越来越多地应用于医药、食品、农药、香料、日用化学品等精细有机合成领域。目前，生物催化已经逐渐被市场接纳，创造了巨大的经济价值。

以重要的化学中间体 6-羟基烟酸的生产为例，6-羟基烟酸在医药、材料、农药等领域应用广泛，是合成吡啶甲胺类农药的重要中间体，与硅反应可生成一种发冷光的材料，和氯反应可生成的 5, 6-二氯烟酸，是一种可以阻止人体对脂肪的吸收和促进脂肪酶对脂肪降解的物质，可以作为一种减肥药。瑞士 Lonza 公司利用无色杆菌（*Achromobacter xylosoxidans*）中羟化酶可高效催化烟酸 6-羟化生成 6-羟基烟酸，该方法已成功替代原有的化学催化工艺。目前我国也掌握了生物催化合成 6-羟基烟酸的关键技术，解决了 6-羟基烟酸进口价格昂贵的问题。

在手性化合物的合成方面，由于手性药物的不同对映体作用不同，如巴比妥药 DMBB 与 MPPB 左旋(－)-异构体均具有抗惊厥性，而右旋(＋)-异构体的功能则是促惊厥，从疗效和安全性出发，单一对映体的分离和定向合成十分必要。由于酶在催化中的高选择特性，生物催化法在手性技术领域的份额正逐渐增加，被认为是一种更有效、更经济的手性合成法。德国 BASF 公司已经建立了酶法拆分手性仲醇和手性胺的技术平台，浙江大学使用非水相酶催化技术生产 *S*-烯丙醇酮和 *S*-氰醇等拟除虫菊酯中间体的工艺也已经在工业上大规模应用。利用酶的催化专一性合成头孢菌素，只用两步就可以替代传统的化学法生产，从而减少了工艺流程，提高了产量和纯度。

酶促反应动力学（kinetics of enzyme-catalyzed reaction）是在生物催化过程的基础上，研究酶促反应的速度以及影响此速度的各种因素，如底物浓度、酶浓度、抑制剂与激活剂、pH 和温度等，寻找有利的反应条件，较大限度地提高酶催化反应的效率。研究酶反应动力学规律的著名的米氏方程（Michaelis Menten equation），是由 Michaelis 和 Menten（图 2-1）于 1913 年提出的反应速度和底物浓度关系的数学方程式。他们应用“快速平衡”解析方法对该速率方程进行了详细的研究。米氏方程又名 Michaelis-Menten 方程，常简称为“M-M”方程。1925 年，研究人员提出了“稳态法”解析方法，对 M-M 方程的推导方法进行了修

正，更准确地描述酶催化过程。目前酶促反应动力学已得到快速发展，动力学方程也被不断地完善。

对于从事酶应用研究的工程技术人员，除了要了解酶的反应机制之外，应着重研究酶的总反应速率，从而定量解析影响总反应速率的各种因素，建立可靠的总反应速率方程式，发挥酶催化反应的高效率，寻找最有利的反应条件，为反应器的合理设计和酶催化反应操作条件的最优化奠定基础。




Michaelis L



Menten M L

图 2-1　米氏方程提出者 Michaelis L 和 Menten M L

2.1　酶的基本特征

酶是生物为提高其生化反应效率而产生的生物催化剂，酶的蛋白质属性普遍被人们接受，少数酶同时含有少量的糖和脂肪。20 世纪 80 年代初，研究人员发现了有催化功能的 RNA，并称之为核酶，核酶是唯一的非蛋白酶，能够催化 RNA 分子中的磷酸酯键的水解及其逆反应。在生物体内，所有的反应均在酶的催化作用下完成，几乎所有生物的生理现象都与酶的作用紧密联系，目前已知的酶有 3000 余种。国际生物化学协会（IUB）根据催化反应的类型，将酶分为 6 大类：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、合成酶。

2.1.1　酶的作用体现为可降低反应活化能

在任何化学反应中，反应物分子必须超过一定的能阈，成为活化的状态，才能发生变化，形成产物。这种促使低能分子达到活化状态的能量，称为活化能。催化剂的作用主要是降低反应所需的活化能，以致相同的能量能使更多的分子活化，从而加速反应的进行。酶作为生物催化剂的作用同样是降低反应的活化能，加快生化反应的速率，但它不改变反应的方向和平衡关系，即它不能改变反应的平衡常数，而只能加快反应达到平衡的速率。酶在反应过程中，其立体结构和离子价态可以发生某种变化，但在反应结束时，一般酶本身不消耗，并恢复到原来状态。由于酶可以显著地降低活化能，故表现出高度的催化效率（图 2-2）。例如，过氧化氢酶催化过氧化氢的分解，可将无催化剂时的反应活化能从 $75.31\,\mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$ 降低为 $8.37\,\mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$。

2.1.2　中间复合物学说

一般认为，酶催化某一反应时，首先是在酶的活性中心与底物结合生成酶－底物复合物，此复合物再进行分解而释放出酶，同时生成一种或数种产物，此过程可用式（2-1）表示。

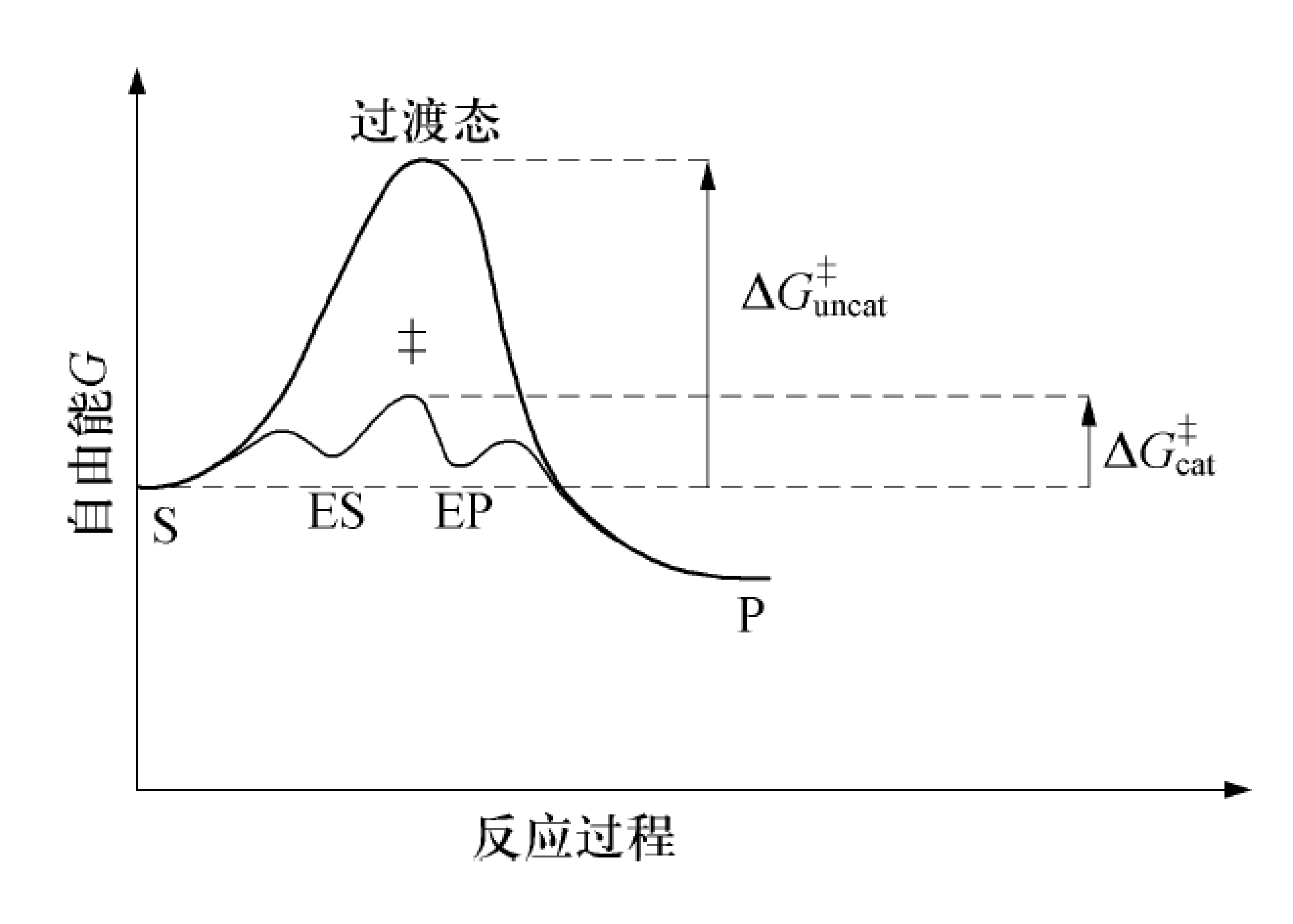


图 2-2　酶促反应过程中能量的变化

E 表示酶；S 表示底物；P 表示产物；ES 表示酶底物复合物；EP 表示酶产物复合物；
ΔG 表示自由能变化；cat 表示有催化剂；uncat 表示无催化剂；‡ 表示活化能峰值

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P \tag{2-1}$$

式中，E 表示酶，S 表示底物，ES 表示酶与底物形成复合物（中间产物），P 表示反应产物。由于 ES 的形成速度很快，且很不稳定，一般不易得到 ES 复合物存在的直接证据。但从溶菌酶结构的研究中，已制成它与底物形成复合物的结晶，并得到了 X 射线衍射图，证明了 ES 复合物的存在（图 2-3）。ES 的形成，改变了原来反应的途径，可使底物的活化能大大降低，从而使反应加速。

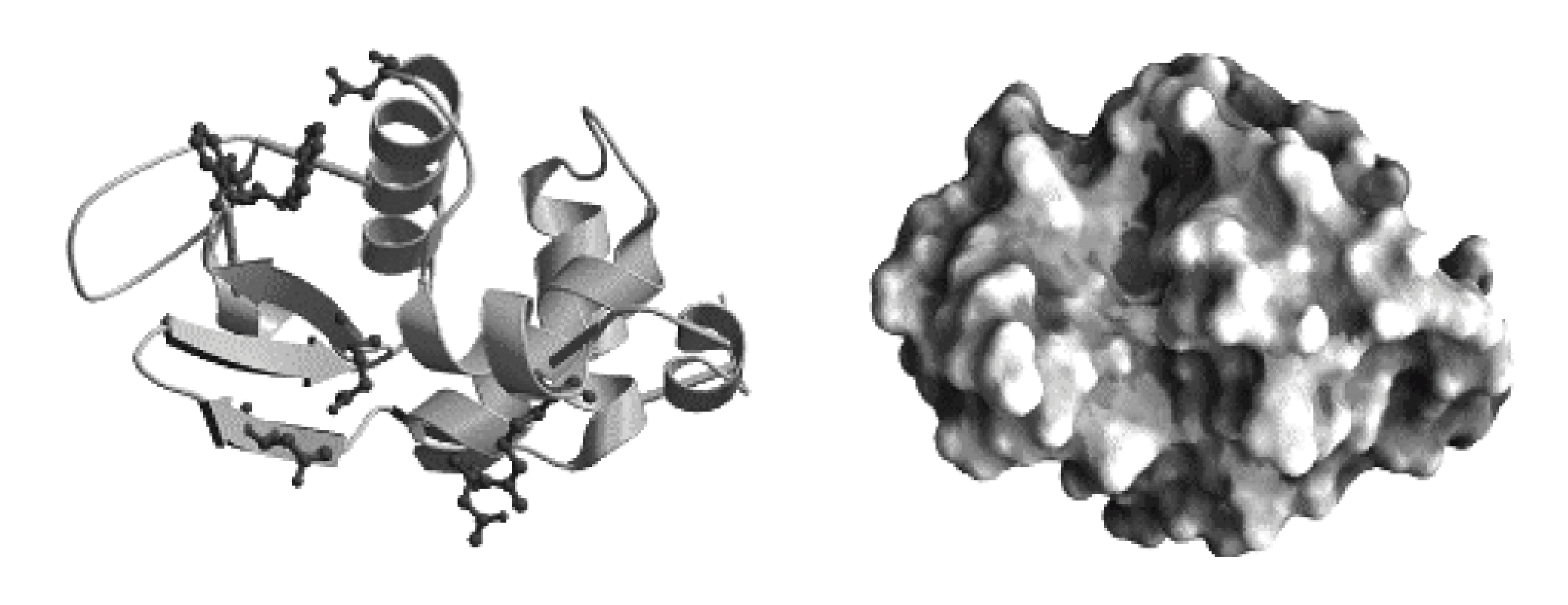


图 2-3　溶菌酶催化反应时与底物结合形成中间复合物的空间结构

2.1.3　酶催化反应特性

与化学催化剂相比较，酶作为生物催化剂具有以下几点鲜明的特征。

（1）高效性：酶的催化效率比化学催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍，比非催化反应高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍。例如，过氧化氢分解反应（$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$）用 Fe^{3+} 催化，效率为 6×10^{-4} $mol \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$，而用过氧化氢酶催化，效率为 $6 \times 10^6 mol \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$。

（2）专一性：由于酶蛋白具有的特殊的立体结构，使得酶只能对特定的一种或一类底物起作用。根据作用底物的不同，酶的专一性分为绝对专一性、相对专一性和立体异构特异性：①绝对专一性是指一种酶只作用于一种底物，催化特定的反应，如脲酶只能催化尿素生成氨和二氧化碳，而不能催化甲基尿素的水解。②相对专一性是指酶对结构相近的一类底物都有作用，也可细分为键专一性和基团专一性。基团（group）专一性，如 β-葡萄糖苷酶，催化由 β-葡萄糖所构成的糖苷水解，但对于糖苷的另一端没有严格要求。键（bond）专一

性的例子如酯酶催化酯的水解，对于酯两端的基团没有严格的要求。③立体异构特异性是指酶对底物的立体构型有特异要求，它只对底物的某一种构型起作用，而不催化其他异构体，可以细分为光学专一性和几何异构专一性。例如 *L*-乳酸脱氢酶的底物只能催化 *L*-乳酸，而不能以 *D*-乳酸为底物。酶的立体构型特异性表明，酶与底物的结合至少存在 3 个结合位点。

（3）反应条件温和：酶促反应一般在常温、常压、中性 pH 条件下进行，酶反应条件温和但不稳定，剧烈条件如强酸、强碱、有机溶剂、重金属盐、高温、紫外线、剧烈振荡等任何使蛋白质变性的理化因素都可能使酶变性而失去其催化活性。

（4）酶的催化活性可调节控制：如抑制剂调节、共价修饰调节、反馈调节、酶原激活及激素控制等。还有些酶催化活力与辅酶、辅基及金属离子有关。

作为生物催化剂，虽然酶具有以上的特殊性质，但酶在生产过程存在提取工艺烦琐，成本昂贵，且大多在水溶液中进行反应等限制因素，制约了酶的工业化应用。

2.1.4　酶活力

1. 酶活力定义　酶活力又称酶活，是指酶催化化学反应的能力。酶活力的大小可用在一定的条件下酶催化某一化学反应的反应速度来表示。二者之间的关系为：酶催化的反应速率越大，酶的活力就越大；反应速率越小，酶的活力就越低。所以，测定酶的活力就是测定酶所催化的化学反应的速度。化学反应速度可用单位时间内底物的减少量或产物的生成量来表示。但是，在一般的酶促反应体系中，底物的量往往是过量的。底物减少量仅为底物总量的很小一部分，不易准确测定。而产物从无到有，较易准确测定。由于在酶促反应中，底物的减少与产物的增加速率相等，因此一般用单位时间内产物生成的量来表示酶催化的反应速度。但必须注意，酶促反应动力学所指明的速度是反应的初速度，因为此时反应速度与酶的浓度呈正比关系，这样避免了反应产物以及其他因素的影响（图 2-4）。根据酶促反应的速率曲线，测定酶活力要测定反应的初速度（例如底物开始反应后 5 ~ 10min 所具有的速度）。

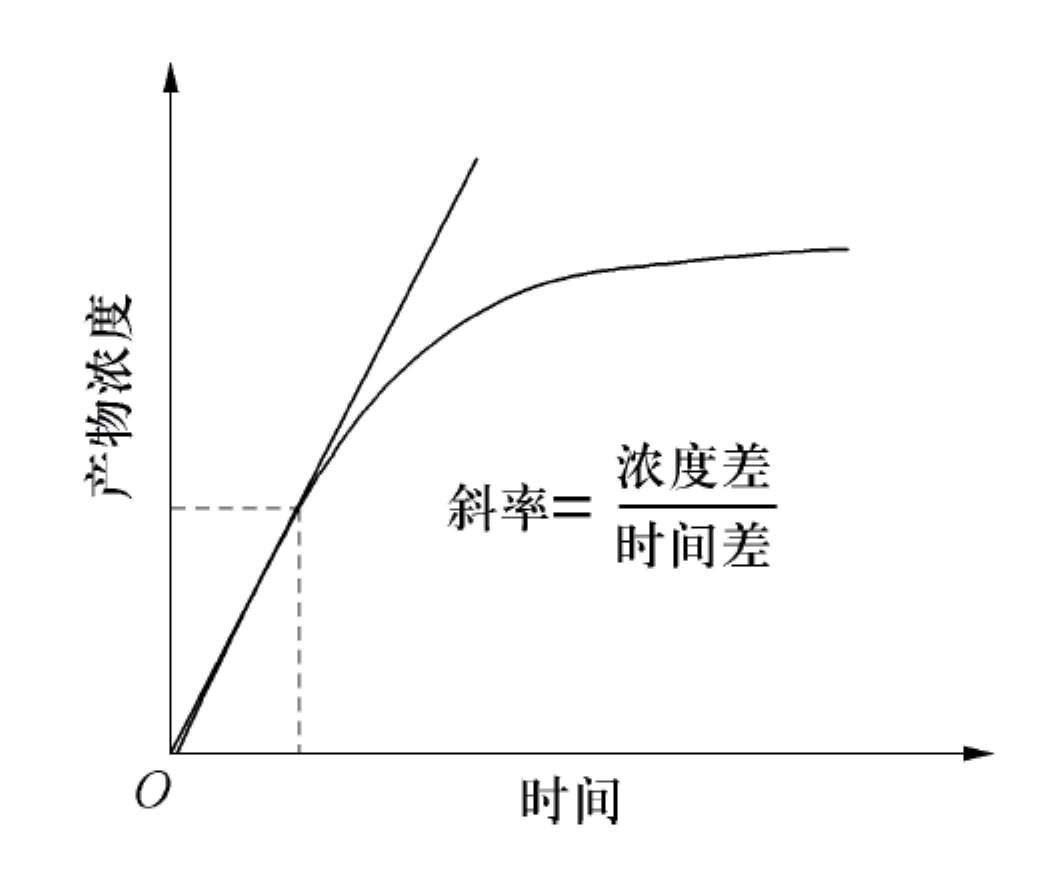


图 2-4　酶促反应的时间进程曲线

2. 酶活力单位　酶活力的大小可用酶活力单位来表示。酶活力单位是指在特定的条件下，酶促反应在单位时间内生成一定量的产物或消耗一定量的底物所需的酶量。这种表示法随测定条件不同而异，国际上通用的酶活力单位有以下两种。

（1）国际单位：1961 年，国际酶学委员会（Enzyme Commission，EC）规定：1 个酶活力国际单位（international unit，IU）是指在 25℃、最适底物浓度、最适缓冲液的离子强度以及最适 pH 等条件下，每分钟催化减少 1μmol · L^{-1}底物或生成 1μmol · L^{-1}产物所需的酶量。如果酶的底物中有一个以上的可被作用的键或基团，则一个国际单位是：每分钟催化 1μmol · L^{-1}的有关基团或键的变化所需的酶量。

（2）转换数（turnover number，TN）：在最适条件下，每秒钟或每分钟每个酶分子转换底物的分子数，或每秒钟或每分钟每摩尔酶转换底物的摩尔数，即 Katal（Kat）单位。为了使酶的活力单位与国际单位制中的反应速度表达方式相一致，1972 年国际酶学委员会推荐使用 Kat 单位。Kat 单位和国际单位之间的换算关系：$1\text{Kat} = 6 \times 10^7\text{U}$。

（3）比活力：酶的比活力也称为比活性，是指每毫克酶蛋白所具有的活力单位数。有时也用每克酶制剂或每毫升酶制剂所含有的活力单位数来表示。比活力是表示酶制剂纯度的一个重要指标。对同一种酶来说，酶的比活力越高，纯度越高。

测定酶的活力常使用的方法：分光光度法、荧光法、放射性核素测定法、电化学法等。

2.1.5 酶作用高效率的机制

酶高效催化的机制目前仍然不是十分清楚，但研究发现影响酶高效催化的主要因素包括以下 4 种。

（1）趋近效应（approximation）和定向效应（orientation）：酶可以将它的底物结合在它的活性部位。由于化学反应速度与反应物浓度成正比，在反应系统的某一局部区域，底物浓度增加，则反应速度也随之增加。此外，酶与底物间的靠近具有一定的取向，这样底物分子才被作用，大大增加 ES 复合物进入活化状态的概率。

（2）张力作用（distortion or strain）：底物的结合可诱导酶分子构象发生变化，比底物大得多的酶分子的三、四级结构的变化，也可对底物产生张力作用，使底物扭曲，促进底物和酶复合物进入活化状态。

（3）酸碱催化作用（acid-base catalysis）：酶的活性中心具有某些氨基酸残基的 R 基团，这些基团往往是良好的质子供体或受体，在水溶液中，这些广义的酸性基团或碱性基团对许多化学反应是有力的催化剂。

（4）共价催化作用（covalent catalysis）：某些酶能与底物形成极不稳定的、共价结合的 ES 复合物，这些复合物比无酶存在时更容易进行化学反应。

2.2 均相酶反应动力学

酶促反应动力学是研究酶促反应速度的规律以及影响酶促反应速度的各种因素的科学。影响酶促反应速度的因素主要包括酶浓度、底物浓度、pH、温度、抑制剂和激活剂等。在研究某一因素对酶促反应速度的影响时，应该维持反应中其他因素不变，而只改变要研究的因素。但必须注意，酶促反应动力学中所指明的速度是反应的初速度，因为此时反应速度与酶的浓度呈正比关系，这样避免了反应产物以及其他因素的影响。

酶促反应动力学的研究有助于阐明酶的结构与功能的关系，也可为酶作用机制的研究提供数据，有助于寻找最有利的反应条件，最大限度地发挥酶催化反应的高效率，有助于了解酶在代谢中的作用或某些药物作用的机制等，该研究具有重要的理论意义和实际意义。

均相酶反应是指酶与反应物处于同一相——液相的酶催化反应，因此它不存在相间的物质传递。均相酶反应动力学所描述的是反应速率与反应物的基本关系，反映了该反应过程的本征动力学关系，而且酶与反应物的反应，也是分子水平上的反应。因而均相酶反应动力学作为阐明酶反应机制的重要手段而得到了发展。它通过研究反应速率的各种因素，对各基元反应过程（只包含一个基元步骤的反应，即没有中间产物一步完成的反应）进行静态和动态的分析，获得反应机制的有关信息。

2.2.1 简单的酶反应动力学

简单的酶催化反应动力学是指由一种反应物（底物）参与的不可逆反应。属于此类反

应的有酶催化的水解反应和异构化反应。这种简单的单底物酶催化动力学，是酶反应动力学的基础。

1．酶浓度对反应速度的影响　在酶促反应过程中，在一定的温度和 pH 条件下，当底物浓度大大超过酶的浓度时，随着酶浓度的增加，形成的酶－底物中间复合物的量也增加，反应加速。如图 2-5 所示，酶的浓度在一定范围内与反应速度呈正比关系。

2．单底物酶反应动力学

1）底物浓度与酶促反应速度的关系曲线：在其他因素，如酶浓度、pH、温度等不变的情况下，底物浓度的变化与酶促反应速度呈矩形双曲线关系（rectangular hyperbola）（图2-6）。在底物浓度很低时，由于酶分子呈现过剩状态，反应速度随底物浓度的增加而急剧上升，两者呈正比关系，表现为一级反应（first order reaction）。当底物浓度较高时，反应速度随底物浓度的增加而缓慢增加，表现为混合级反应（mixed order reaction）。当底物浓度达到一定极限时，反应速度达到最大值，表现为零级反应（zero order reaction）。此时，酶处于饱和状态。所有的酶都有饱和现象，只是达到饱和时所需的底物浓度不同而已。

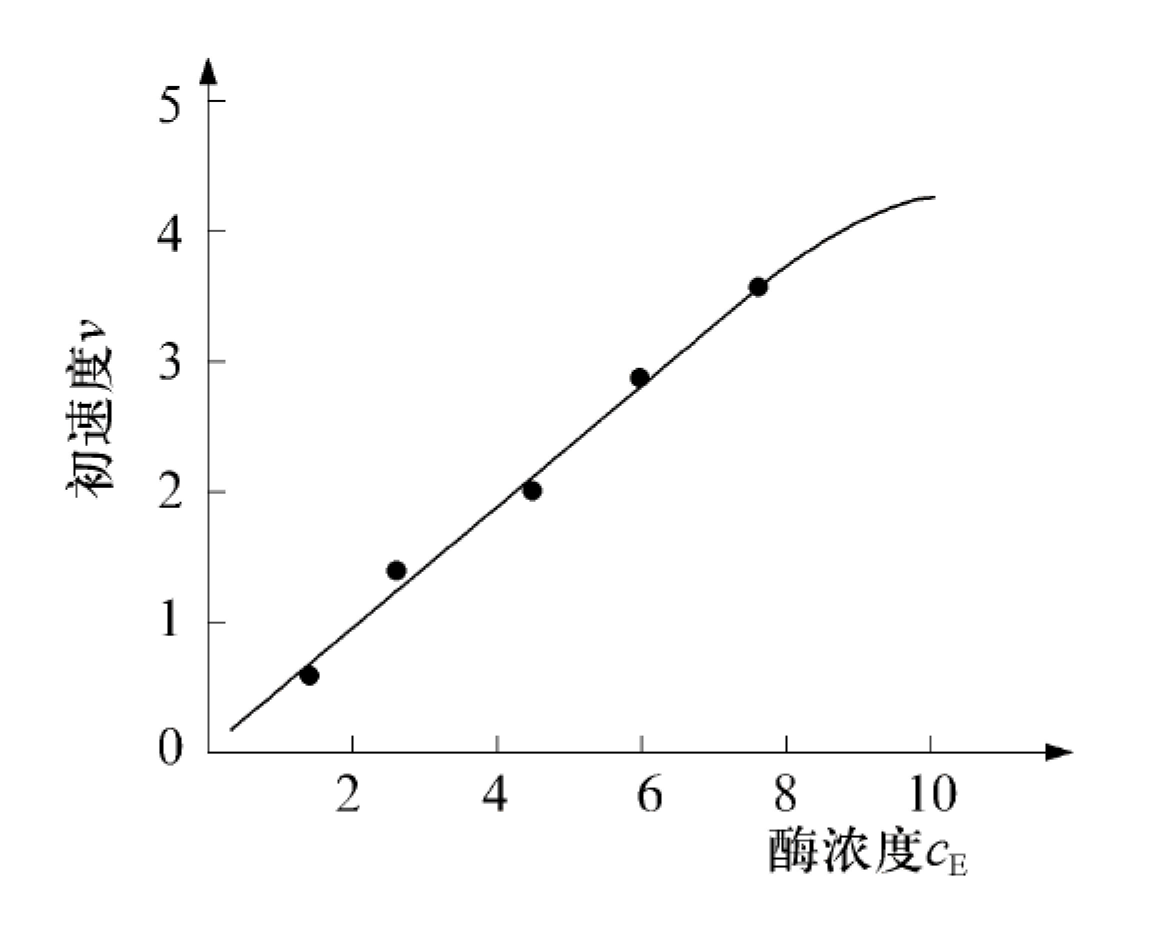


图 2-5　酶浓度对反应速度的影响

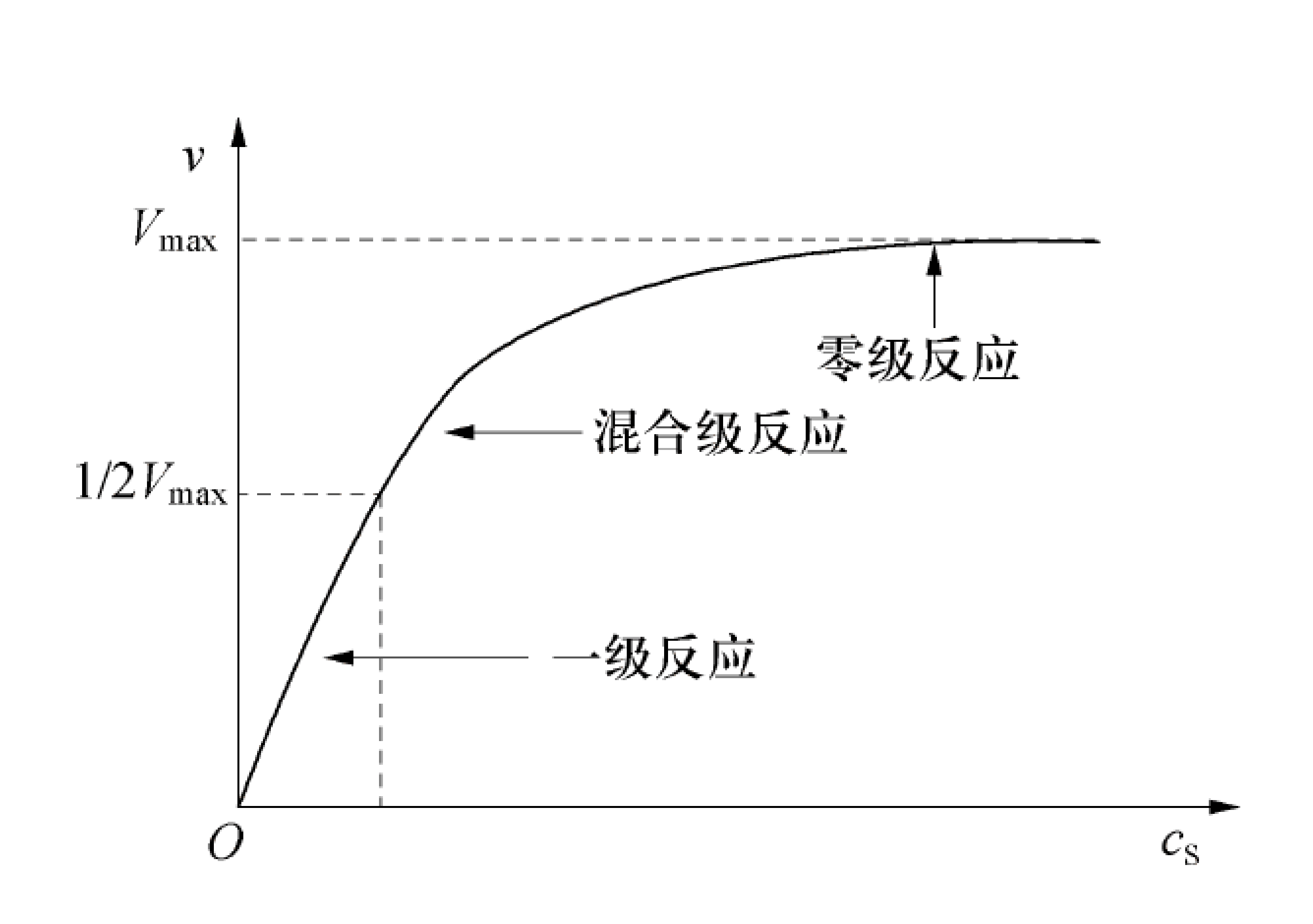


图 2-6　底物浓度对反应速度的影响

对酶促反应来说，影响其速度的最关键因素是底物浓度 c_S。研究底物浓度的影响时，常常因反应过程中底物不断向产物转变而使问题复杂化，因此在动力学实验中通常使用一种简单的方法，即在底物浓度远大于酶浓度的条件下，测定反应最初瞬间的速度，通常称为初速度 v_0。如果时间足够短，c_S 的变化可以忽略不计。

2）米氏方程：单底物酶反应动力学指由一种反应底物参与的不可逆反应。属于此类反应的有酶的水解反应和异构化反应。这种简单的单底物酶反应动力学是酶反应动力学的基础。解释酶促反应中底物浓度和反应速度关系的最合理学说是中间产物学说，是 Henri 和 Wurtz 于 1903 年提出的，即酶和底物结合而形成 ES 是酶促反应的必需步骤。酶首先与底物结合生成酶与底物复合物（中间产物），此复合物再分解为产物和游离的酶。Michaelis 和 Menten 提出的反应速度和底物浓度关系的米氏方程，适用于只有一个底物结合位点的单底物酶催化反应，最简单的反应方程式为

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{2-2}$$

式中：E 表示游离酶；ES 表示酶底物复合物；S 表示底物；P 表示产物；k_1、k_{-1}、k_2 表示相应各步的反应速率常数。

在米氏方程推导过程中，假设与底物浓度相比，酶的浓度很小，因而可以忽略由于生成

中间复合物而消耗的底物；$k_2 < k_{-1}$，酶、底物、酶－底物复合物之间达到平衡态（equilibrium），即 $E + S \rightleftharpoons ES$ 之间的平衡迅速建立，复合物解离形成的产物 P 浓度很低，不足以破坏这一平衡，则

$$k_1 c_E c_S = k_{-1} c_{ES} \tag{2-3}$$

ES 的解离常数 $K_S = \frac{c_E c_S}{c_{ES}} = \frac{k_{-1}}{k_1}$，则

$$c_E = \frac{k_{-1} c_{ES}}{k_1 c_S} \tag{2-4}$$

反应过程中，酶的浓度保持恒定，即 $c_{E_0} = c_{ES} + c_E$；

而 $v_0 = k_2 c_{ES}$，所以

$$\frac{v_0}{c_{E_0}} = \frac{k_2 c_{ES}}{c_E + c_S} \tag{2-5}$$

若底物浓度很高，所有的酶都以酶－底物复合物形式存在，初速度 v_0 达到最大值 V_{max} 时，$V_{max} = k_2 c_{E_0}$，以 V_{max} 代替 $k_2 c_{E_0}$，则

$$v = \frac{V_{max} c_S}{K_S + c_S} \tag{2-6}$$

此式即为 M-M 方程或米氏方程。式中：V_{max} 表示最大反应速度；c_S 表示底物浓度；K_S 表示米氏常数（Michaelis constant）；v 表示在不同 c_S 时的反应速度。

当底物浓度很低（$c_S \ll K_S$）时，则 $v = \frac{V_{max} c_S}{K_S}$，反应速度与底物浓度成正比。

当底物浓度很高（$c_S \gg K_S$）时，$v \approx V_{max}$，反应速度达到最大速度，再增加底物浓度也不影响反应速度。

米氏方程通常假设底物浓度远高于酶浓度，作为催化剂的酶在反应中只需要低浓度存在，因此对少量饱和的酶为一级反应时的低底物浓度，实际上比酶浓度高出几千倍，原因是酶－底物复合物形成过程是可逆反应。由于底物初浓度 c_{S_0} 远高于酶初浓度 c_{E_0}，则酶－底物复合物的形成对底物浓度变化而言可以忽略，所以 v_0 表达式中的底物浓度即底物初浓度 c_{S_0}。

米氏方程可解释一些实验事实，但无普遍适用性，因为有些酶促反应速度很快，足以破坏米氏假定的平衡条件。因此，当产物生成速率、复合物分解速率、酶与底物的结合速率相差不大时，米氏方程的平衡假设不适用。

1925 年，Briggs 和 Haldane 对米氏方程式引入了更为普遍的假设：在初速度范围内，酶浓度远低于底物浓度，则酶－底物复合物浓度也很低。除了反应初期的瞬间，c_{ES} 的变化速率相对于 c_P 而言可以忽略，即反应一段时间后，ES 的生成速度和分解速度相同，即中间复合物的浓度不再随时间而变化，这就是“拟稳态”假设（2-7）。

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = 0 \tag{2-7}$$

经补充和发展的米氏方程公式推导如下：

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \tag{2-8}$$

c_{ES} 的生成与分解处于动态平衡（稳态），有时必须考虑 c_{ES} 分解成产物 P 对于 c_{ES} 动态平衡的影响（c_{ES} 分解速率）。或者说，c_{ES} 的动态平衡（分解速率）不仅与 $ES \longrightarrow E + S$ 有关，

还与 ES ⟶P + E 有关。

从式（2-8）中可知，ES 的生成途径来自 E + S 和 E + P，但其中 E + P 生成 ES 的速度极慢（尤其在起始阶段，P 的生成很少），可以忽略不计，又因为底物浓度大大超过酶的浓度（$c_S \gg c_E$），中间产物 ES 中的 S 浓度可以忽略不计，因此，ES 的生成速度为

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1(c_{E_t} - c_{ES}) \cdot c_S \tag{2-9}$$

其中 c_{E_t} 为酶的总浓度，$c_{E_t} - c_{ES}$ 为游离酶的浓度，ES 的分解速度为

$$-\frac{dc_{ES}}{dt} = k_{-1}c_{ES} + k_2c_{ES} = (k_{-1} + k_2)c_{ES} \tag{2-10}$$

当反应体系处于稳态时，ES 生成和分解的速度相等，即

$$k_1(c_{E_t} - c_{ES}) \cdot c_S = (k_{-1} + k_2)c_{ES} \tag{2-11}$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{(c_{E_t} - c_{ES}) \cdot c_S}{c_{ES}}$$

令 $K_m = \dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1}$，则

$$K_m = \frac{(c_{E_t} - c_{ES}) \cdot c_S}{c_{ES}} \tag{2-12}$$

$$c_{ES} = \frac{c_{E_t}c_S}{K_m + c_S} \tag{2-13}$$

由于反应速度取决于产物 P 的生成量，故

$$v = k_2c_{ES} \tag{2-14}$$

在酶促反应达最大速度时，所有的酶分子都已与底物结合形成中间产物，此时

$$c_{E_t} = c_{ES} \tag{2-15}$$

那么

$$V_{max} = k_2c_{E_t} \tag{2-16}$$

在式（2-13）两边乘以 k_2 得

$k_2 \cdot c_{ES} = \dfrac{k_2 \cdot c_{E_t}c_S}{K_m + c_S}$，以式（2-14）和式（2-16）代入，即

$$v = \frac{V_{max}c_S}{K_m + c_S} \tag{2-17}$$

这一关系式与米氏方程形式相同，只是常数定义不同，因此仍称为米氏方程，K_m 定义为米氏常数，当 $k_{-1} \gg k_2$ 时，$K_m = K_S$。

3）米氏常数的意义：当反应速度为最大速度一半时，米氏方程可以进行如下变换。

当 $v = V_{max}/2$ 时，

$$\frac{1}{2}V_{max} = \frac{V_{max}c_S}{K_m + c_S} \tag{2-18}$$

进一步整理可得到

$$K_m = c_S \tag{2-19}$$

即 K_m 值等于酶反应速度为最大速度一半时的底物浓度（图 2-7）。

米氏常数的单位为浓度单位，一般用 $mol \cdot L^{-1}$ 或 $mmol \cdot L^{-1}$ 表示。分析米氏方程和底物

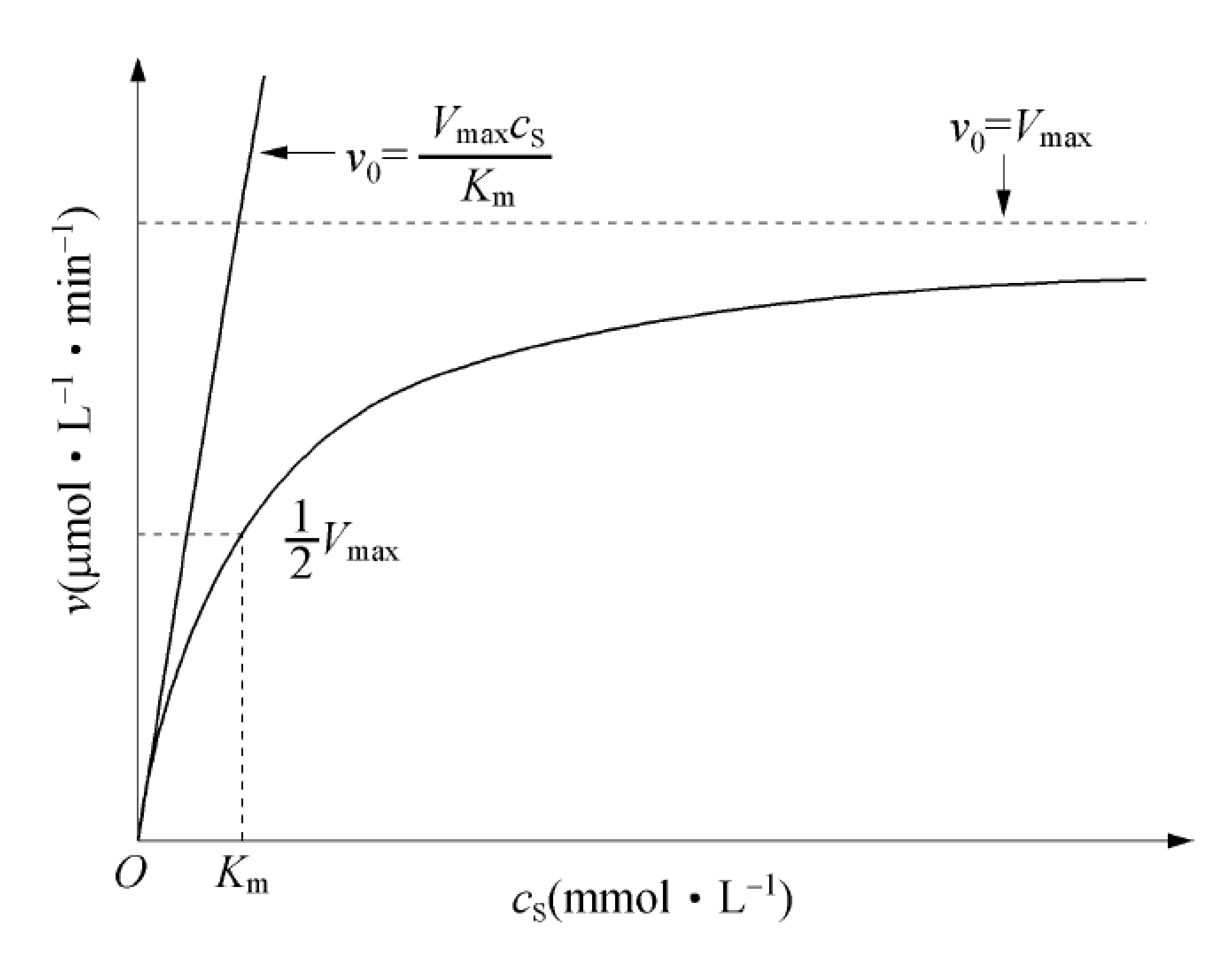


图 2-7　底物浓度对反应初速度的影响

浓度与酶促反应速度关系图（图 2-7），可以得出以下几点结论：

（1）当底物浓度很大时，酶促反应速度趋近一个极限值，即最大反应速度。

（2）K_m 值的大小可以近似地表示酶和底物的亲和力。K_m 值大，酶和底物的亲和力小，反之则大。米氏方程只适用于单底物酶促反应过程。

因为 $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$，当 $k_{-1} \gg k_2$，即 ES 解离成 E 和 S 的速度大大超过分离成 E 和 P 的速度时，k_2 可以忽略不计，此时 K_m 值近似于 ES 解离常数 K_S，此时 K_m 值可用来表示酶对底物的亲和力。

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{c_E c_S}{c_{ES}} = K_S \tag{2-20}$$

K_m 值越大，酶与底物的亲和力越小；K_m 值越小，酶与底物亲和力越大，即不需要很高的底物浓度，便可容易地达到最大反应速度。但是 k_2 值并非在所有酶促反应中都远小于 k_{-1}，所以 K_S 值（又称酶促反应的底物常数）和 K_m 值的含义不同，不能互相代替使用。当 k_2 不远远小于 k_{-1} 和 k_1 时，K_m 表示整个反应的化学平衡的常数。

（3）K_m 是酶的特征性常数之一，其大小只与酶的性质、酶所催化的底物和酶促反应条件（如温度、pH、有无抑制剂等）有关，与酶的浓度无关。酶的种类不同，K_m 值不同，同一种酶与不同底物作用时，K_m 值也不同。各种酶的 K_m 值分布范围很广，为 $10^{-6} \sim 10^{-1}$ mol · L^{-1}。对酶促反应而言，在一定的条件下都有特定的 K_m 值，该值可用来鉴别酶。

（4）对于作用于多个底物的酶，不同的底物有不同的 K_m 值，具有最小的 K_m 值或最高的 V_{max}/K_m 比值的底物就是该酶的最适底物，或称天然底物，因此根据 K_m 值可以判断酶的最佳底物。

（5）催化可逆反应的酶，当正反应和逆反应 K_m 值不同时，可以大致推测该酶正、逆两向反应的效率，K_m 值小的底物进行的反应方向应是该酶催化的优势方向。

（6）当一系列的酶催化一个代谢过程的连锁反应时，如能确定各种酶 K_m 值及相应的底物浓度，有助于寻找代谢过程的限速步骤。一般 K_m 值大的酶为限速酶。

（7）根据米氏方程，若已知某酶的 K_m 值，就可以计算在一定的底物浓度下的反应速率相当于 V_{max} 的百分率。

米氏方程和 K_m 值很重要，它不仅是酶性质的表现，而且在实践中有很多应用。当使用

酶制剂时，可以根据 K_m 值判断使酶维持一定反应速度时需要多大的底物浓度。例如，如果要求酶促反应速度达到最大速度的 99%，将 $v=99\%\ V_{max}$ 带入米氏方程可得 $c_S=99K_m$。反过来，在已经规定了底物浓度的条件下，也可根据 K_m 值估算出能够获得多大的反应速度。再如当反应体系的 $c_S=9K_m$ 时，通过米氏方程可知此时的酶促反应速度 $v=0.9V_{max}$。

对于一个酶促反应，酶总是以两种形式存在：未与底物结合的游离酶和与底物结合的 ES 复合物。在米氏常数 $K_m \gg c_S$ 时，大多数酶以游离形式存在，此时反应速度与 c_S 成正比。当所有酶以 ES 形式存在时，酶促反应的速度达到最大速度，在这种情况下，酶被底物饱和，因此进一步增加 c_S 对反应速度无影响。当 ES 复合物分解成产物后，酶又重新成为游离形式并再与另一底物分子结合发生反应。饱和效应是酶促反应的显著特点。当酶先与过量底物混合时，会先有一个起始阶段，即稳态前，在这个阶段形成一定浓度 ES。这通常是一个很快而难以观察的过程，在 ES 达到一定浓度后，反应达到稳态。在稳态阶段，c_{ES} 近乎恒定。稳态理论是 Briggs 和 Haldane 在 1925 年提出的。尽管 v 被定义在反应的初期阶段，通常称为初速度，但是实验所测到的 v 实际反映了稳态的情况。对这些初速度的分析通常被称为稳态动力学。表 2-1 比较了平衡法和稳态法的差别。

表 2-1　平衡法与稳态法的比较

<table>
<tr><th>项　目</th><th>平　衡　法</th><th>稳　态　法</th></tr>
<tr><td rowspan="3">假设</td><td colspan="2">（1）酶和底物生成不稳定的复合物 ES，酶催化反应是经该中间复合物完成的，即 $E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E+P$</td></tr>
<tr><td>（2）ES 在反应开始后与 E 和 S 迅速达到动态平衡 $K_S=\frac{k_{-1}}{k_1}$</td><td>（2）ES 的生成速率与其解离速率相等，其浓度不随时间而变化 $\frac{dc_{ES}}{dt}=0$</td></tr>
<tr><td colspan="2">（3）底物浓度远远高于酶的浓度 $c_S \gg c_E$</td></tr>
<tr><td>酶量守恒</td><td colspan="2">$c_{E_0}=c_{ES}+c_E$</td></tr>
<tr><td>产物生成速率</td><td colspan="2">$v=k_2 c_{ES}$</td></tr>
<tr><td>动力学方程</td><td>$v=\frac{V_{max}c_S}{K_S+c_S}$</td><td>$v=\frac{V_{max}c_S}{K_m+c_S}$</td></tr>
<tr><td>K_S 与 K_m</td><td>$K_S=\frac{k_{-1}}{k_1}$</td><td>$K_m=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$</td></tr>
</table>

如果 K_m 值已知，任何底物浓度时酶的饱和度 f_{ES}（saturation fraction）（形成中间产物的酶占总酶的比例），便可通过式（2-21）计算出来。

$$f_{ES}=\frac{c_{ES}}{c_{E_t}}=\frac{k_2 c_{ES}}{k_2 c_{E_t}}=\frac{v}{V_{max}}=\frac{c_S}{K_m+c_S} \tag{2-21}$$

4）K_m 和 V_{max} 的求法

（1）双倒数作图（double-reciprocal plot or Lineweaver-Burk plot）：将米氏方程两边取倒数，可转化为下列形式。

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V_{max}}\times\frac{1}{c_S}+\frac{1}{V_{max}} \tag{2-22}$$

从图2-8可知，$1/v$ 对 $1/c_S$ 作图得一直线，其斜率是 K_m/V_{max}，在纵轴上的截距为 $1/V_{max}$，横轴上的截距为 $-1/K_m$，即可得到 K_m 和 V_{max} 的数值。此图除用来求 K_m 和 V_{max} 值外，在研究酶的抑制作用方面还有重要价值。

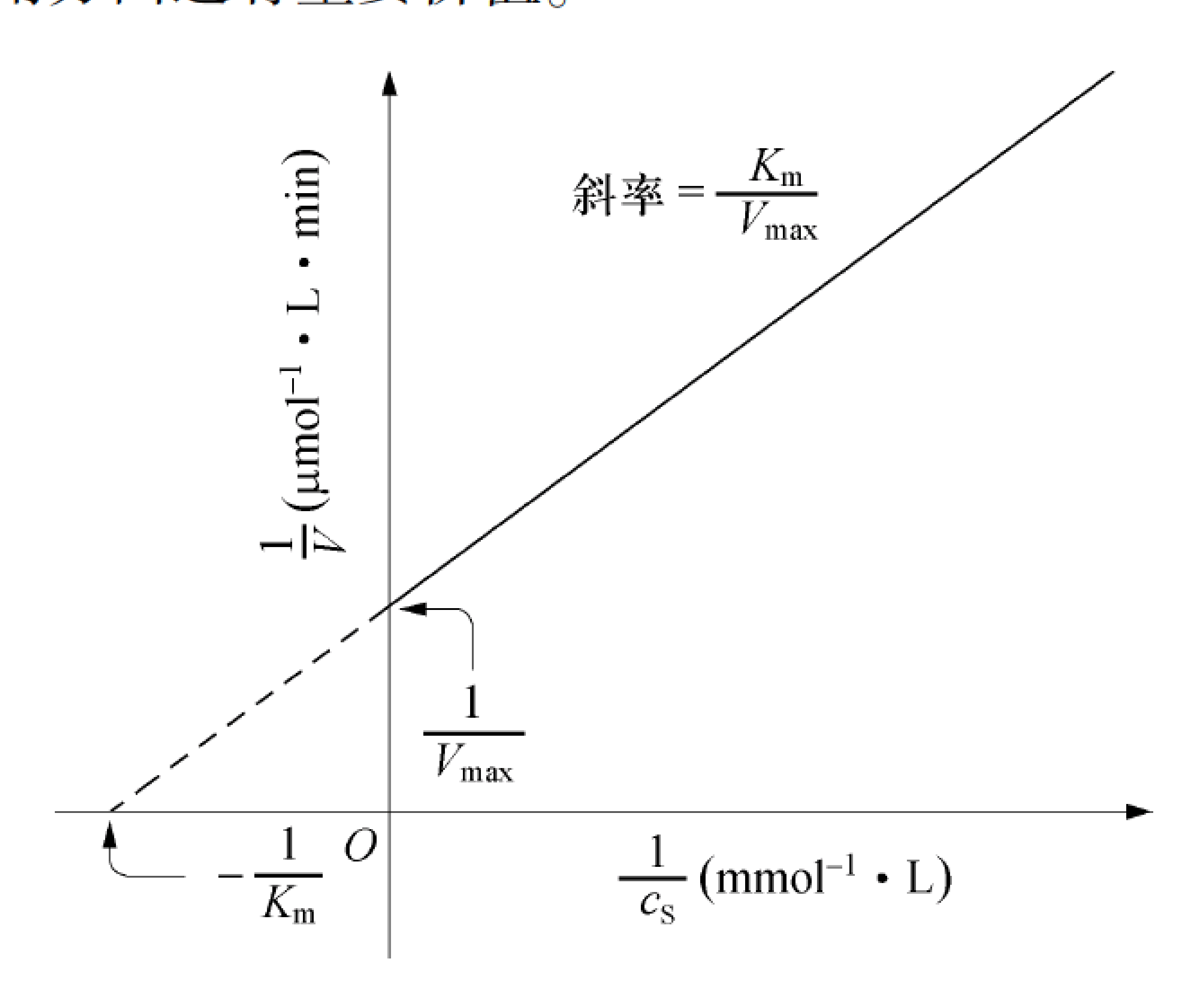


图2-8　双倒数法求解米氏常数

（2）v 对 v/c_S 作图求解米氏常数（Eadic-Hofstee plot）：米氏方程经移项整理后可写成

$$vK_m + vc_S = V_{max}c_S \tag{2-23}$$

即 $vc_S = V_{max}c_S - vK_m$，整理得

$$v = V_{max} - K_m\frac{v}{c_S} \tag{2-24}$$

以 v 为纵坐标对 $\frac{v}{c_S}$ 横坐标作图，所得直线其纵轴的截距为 V_{max}，斜率为 $-K_m$（如图2-9）。

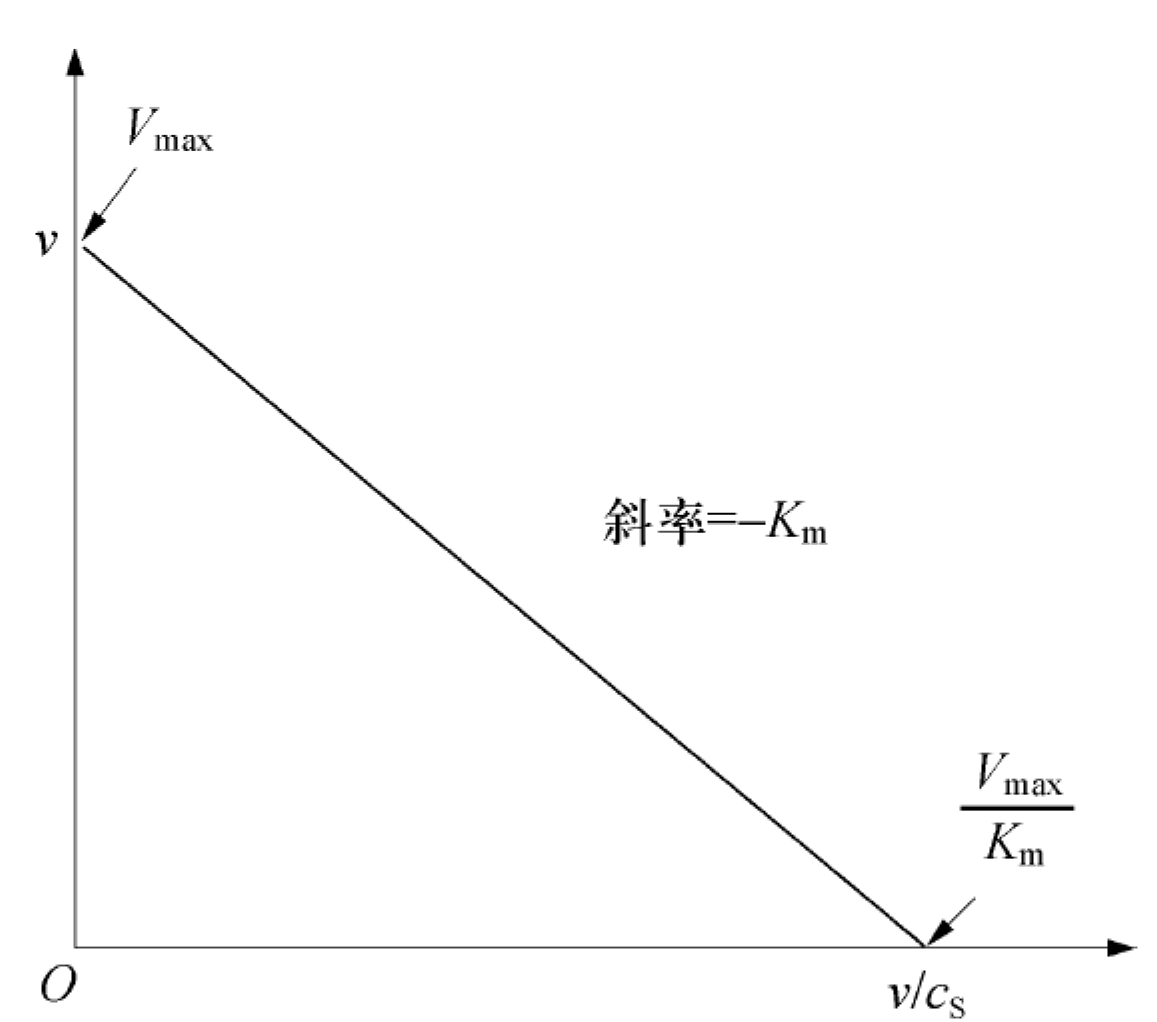


图2-9　v 对 v/c_S 作图求解米氏常数

必须指出，米氏方程只适用于较为简单的酶作用过程，对于比较复杂的酶促反应过程，如多酶体系、多底物、多产物、多中间物等，还不能全面地借此概括和说明，必须借助于复杂的计算过程。

5）动力学参数比较：米氏方程及其建立的特定动力学基础是非常重要的，这个方程可以用来阐述大多数酶的动力学行为，所有以反应速度对 c_S 作图，表现出双曲线依赖关系的

酶都遵循米氏动力学。但是米氏方程并不都依赖于 Michaelis 和 Menten 提出的相对简单的两步反应机制。许多遵循米氏动力学的酶具有截然不同的反应机制，一些具有 6 ~ 8 步的催化反应也常常呈现出稳态行为。尽管此方程对许多酶是适用的，但是 V_{max} 和 K_m 却因酶而异。V_{max} 和 K_m 对一个给定的酶来说是可以通过实验获得的参数，但其本身并不能说明一个连续反应步骤的数目及每步速度和化学本质。这是酶动力学稳态方法的一个很大的局限。但是，在酶催化反应效率鉴定和比较中，稳态动力学仍是一个通用方法，V_{max} 和 K_m 仍有实际意义。不同酶的 K_m 可以差别很大，即使同一种酶针对不同底物而言也不同（表 2-2）。

表 2-2　一些酶对底物的 K_m 值

酶	底　物	K_m（$mmol \cdot L^{-1}$）
过氧化氢酶	H_2O_2	25
己糖激酶	ATP	0.4
己糖激酶	*D*-葡萄糖	0.05
己糖激酶	*D*-果糖	1.5
碳酸酐酶	HCO_3^-	26
胰凝乳蛋白酶	甘氨酰酪氨酰甘氨酸	108
胰凝乳蛋白酶	*N*-苯甲酰酪氨酰胺	2.5
β-半乳糖苷酶	*D*-乳糖	4.0
苏氨酸脱氨酶	*L*-苏氨酸	5.0

K_m 可以用来近似地表示酶与底物的亲和力，而 K_m 的实际意义取决于反应机制，如反应步骤和每步的速度常数。对两步反应来说：

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{k_2}{k_1} + K_S \tag{2-25}$$

显然，$K_m > K_S$，即米氏常数大于解离常数。这一结论仅适用于两步机制。对于 ES 之后还有中间物生成的多步机制的情况下，$K_m < K_S$。根据式（2-14），当 $k_2 \ll k_{-1}$ 时，K_m 可简化为 k_{-1}/k_1，即 ES 的解离常数。在这种情况下，K_m 可表示 ES 复合物中酶与底物的亲和力大小；但当 $k_2 > k_{-1}$ 或 k_2 接近于 k_1 或 k_{-1} 时，K_m 就不能表示酶与底物的亲和力，而是这 3 个速度常数的函数，此时米氏方程仍然适用，饱和现象仍然存在。更多情况下 ES 复合物形成后要经历多步反应，那么 K_m 就是多个速度常数的更为复杂的函数。V_{max} 的大小同样因酶而异。若一个两步反应的酶促反应遵循米氏机制，则 $V_{max} = k_2 c_{E_0}$，此时 k_2 是限速因素。然而反应步骤的数目及限速步骤是因酶而异的。例如，通常情况下产物释放的步骤是限速的，在反应早期 c_P 很低，释放产物的逆反应可以忽略不计，一个三步反应可以描述为

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \xrightarrow{k_3} E + P \tag{2-26}$$

式（2-26）所给出的三步反应机制仍然可在稳态条件下导出米氏方程的形式：

$$v = \frac{K_{cat} c_{E_0} c_S}{K_m + c_S} \tag{2-27}$$

这时的 K_m 和 K_{cat} 分别为

$$K_m = \frac{K_S(k_{-2}+k_3)}{k_{-2}+k_2+k_3} < K_S \qquad (2\text{-}28)$$

$$K_{cat} = \frac{k_2k_3}{k_{-2}+k_2+k_3} < k_3 \qquad (2\text{-}29)$$

如果 c_{EP} 也满足快速平衡，即 $k_{-2} \gg k_3$，则

$$K_m = K_S\frac{k_{-2}}{k_{-2}+k_2} < K_S \qquad (2\text{-}30)$$

$$K_{cat} = \frac{k_2k_3}{k_{-2}+k_2} < k_3 \qquad (2\text{-}31)$$

因此，不论是用稳态假设，还是用快速平衡，ES 之后还有中间物生成的三步机制，米氏常数均小于其解离常数，K_{cat} 小于 k_3，也小于 k_2。只有在特殊的情况下，K_{cat} 才等于某一步正向一级速度常数。例如，当 EP 解离为产物的速度很慢时，即 $k_2 \gg k_3$。如果 $k_2 \gg k_{-2}$，$K_{cat} = k_3$。当 EP 解离生成产物的速度非常快时，$k_3 \ll k_2$ 和 k_{-2}，$K_{cat} = k_2$。因此可以说，K_{cat} 不能大于正反应途径中任何一个一级反应速度常数。它给化学反应速度常数规定了一个下限。在一般情况下，对于在 ES 之后还有中间物生成的多步机制来说，K_{cat} 不等于正反应途径中某一步的一级速度常数，因而酶被底物饱和时的最大反应速度 V_{max} 也不简单地等于某一步的正向速度常数与 c_{E_0} 的乘积，而必须是 $V_{max} = K_{cat}c_{E_0}$。K_{cat} 是一级反应速度常数，即通常所说的转换数，其单位为时间的倒数。它的定义为：当酶被底物饱和时，单位时间内一个酶分子转化底物分子的个数。表 2-3 列举了一些酶的转换数。K_{cat} 和 K_m 常用于不同酶的比较研究中，不论它们的反应机制是简单还是复杂，每种酶都有各自的 K_{cat} 和 K_m，它们反映了酶所催化的反应的化学特性，即使酶在体内环境下，这两个参数也有其参考价值。

表 2-3　一些酶的 K_{cat}

酶	底　　物	K_{cat} (s^{-1})
过氧化氢酶	H_2O_2	4000000
碳酸酐酶	HCO_3^-	40000
乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱	14000
内酰胺酶	氨苄青霉素	200
延胡索酸酶	延胡索酸	80

K_{cat} 和 K_m 这两个参数也常用来评价酶的动力学效率，一般情况下 2 个参数都需要给出，单独给出一个是不充分的。两个催化不同反应的不同的酶可能具有相同的 K_{cat}，但是这些反应在非酶促情况下的速度可能是不同的，因此酶对反应速度的提高会相差很大。实验所测定的 K_m，对一种酶来说常常与细胞中底物浓度相似。在细胞中与含量很低的底物作用的酶和那些与含量高的底物作用的酶相比，前者的 K_m 通常较低。

比较两种酶催化效率或同一种酶对不同底物的作用，最好是给出每个反应的 K_{cat}/K_m，此参数也称为专一性常数。它是 E + S 到 E + P 的转变速度常数。当 $c_S \ll K_m$ 时，式（2-27）可以写成以下形式：

$$v = \frac{K_{cat}}{K_m}c_{E_0}c_S \qquad (2\text{-}32a)$$

其实式（2-32a）对于任意浓度的底物 c_S 和游离酶浓度 c_E 也是成立的：由 $K_m = c_E c_S / c_{ES}$ 得 $c_S = K_m c_{ES} / c_E$，$c_E + c_{ES} = c_{E_0}$，代入式（2-27）可以得到：

$$v = \frac{K_{cat}}{K_m} c_E c_S \qquad (2\text{-}32b)$$

式（2-32a）只是当 $c_S \ll K_m$ 时，大部分酶以游离形式存在（$c_E = c_{E_0}$）的一种特殊情况。K_{cat}/K_m 是表观二级反应速度常数，单位是 $mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$。它不是真实的微观速度常数，只有在反应的限速步骤就是酶与底物相互碰撞的特殊情况下，K_{cat}/K_m 才是真实的微观速度常数。这个常数有一个上限，它是 E 和 S 在溶液中扩散控制的碰撞速度常数，扩散控制速度常数的界限是 $10^8 \sim 10^9 mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$，很多酶的 K_{cat}/K_m 值接近这个范围。这些酶被认为达到最佳催化效率。由于 K_{cat}/K_m 可以确定两个底物（如 S 和 R）竞争同一个酶的专一性程度而被称为专一性常数。由式（2－32b）可以得到：两个底物对同一酶的专一性程度是由 K_{cat} 和 K_m 比值确定的，而不是单独由 K_m 值或 K_{cat} 值确定。

3. pH 对反应速度的影响　酶反应介质的 pH 可影响酶分子，特别是活性中心上必需基团的解离程度和催化基团中质子供体或质子受体所需的离子化状态，也可影响底物和辅酶的解离程度，从而影响酶与底物的结合。只有在特定的 pH 条件下，酶、底物和辅酶的解离情况，最适宜于它们互相结合，并发生催化作用，使酶促反应速度达最大值，这种 pH 称为酶的最适 pH（optimum pH）。它和酶的最稳定 pH 不一定相同，和体内环境的 pH 也未必相同。

最适 pH 不是酶的特征性常数，它受底物浓度、缓冲液的种类和浓度以及酶的纯度等因素的影响。溶液的 pH 大于或小于最适 pH 时都会使酶的活力降低，远离最适 pH 值时甚至导致酶的变性失活。测定酶的活力时，应选用适宜的缓冲液，以保持酶活力的相对恒定。

pH 对酶促反应速度的影响非常明显，其影响曲线呈“钟形”，由图 2-10 可知：①一种酶，在某一特定的 pH 时，酶活力最强，酶促反应速度最大，这一 pH 称为该酶的最适 pH；②在低于最适 pH 的范围内，随着 pH 的升高，反应速度增加；③在高于最适 pH 时，随着 pH 的升高，反应速度降低。

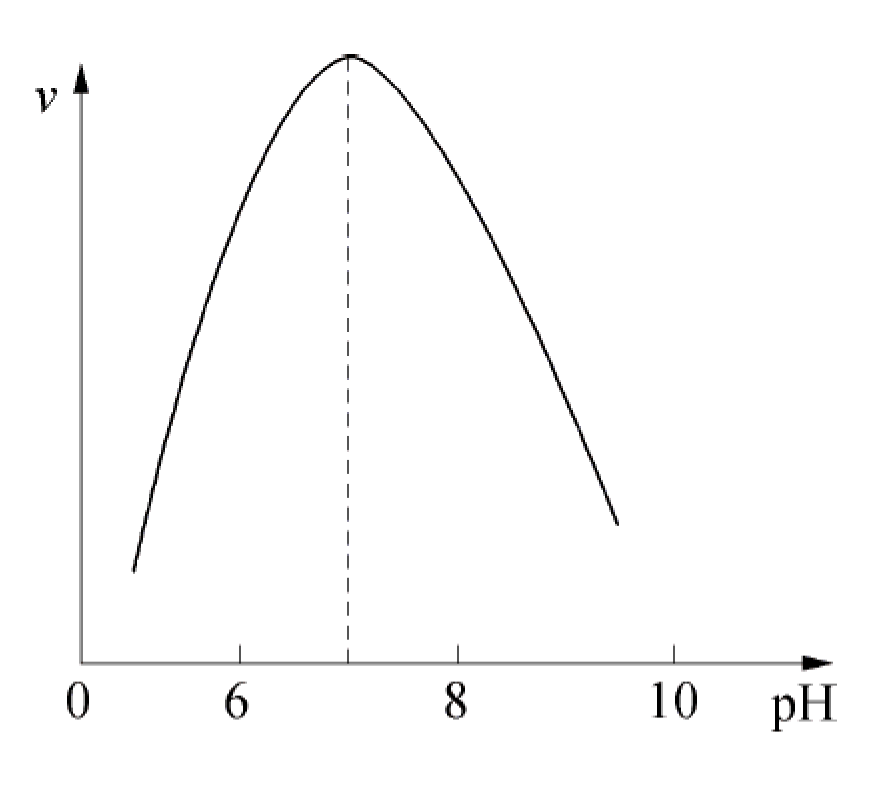


图 2-10　pH 对酶活力的影响

pH 影响酶活力（即酶促反应速度）的主要因素如下所述。

（1）pH 影响酶分子结构的稳定性：因为大多数酶的化学本质是蛋白质，过酸、过碱会引起蛋白质空间结构的改变，蛋白质变性，酶活力丧失。

（2）pH 影响酶分子的解离状态：酶分子中含有许多可解离的极性基团，其解离程度受 pH 的影响。pH 最终影响到整个酶分子的存在形式、带电数量、空间构象等。而对于特定的酶来讲，只有在一定的解离状态时，才具有催化能力或表现最大的催化能力。如胃蛋白酶在正离子状态有活性，胰蛋白酶在负离子状态有活性。

（3）pH 影响底物的解离状态：由于许多底物或辅酶具有离子特性，pH 影响底物的解离状态，或使底物不能和酶结合，或结合后不能生成产物。如 pH 为 9.0～10.0 时，精氨酸解离成正离子，精氨酸酶解离成负离子，才能发生催化作用。

动物体内多数酶的最适 pH 为 6.5～8.0，基本接近中性，如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶最适的 pH 为 7.8（图 2-11（a））。但有些酶，如胃蛋白酶的最适 pH 约为 1.8（图 2-11（b））。

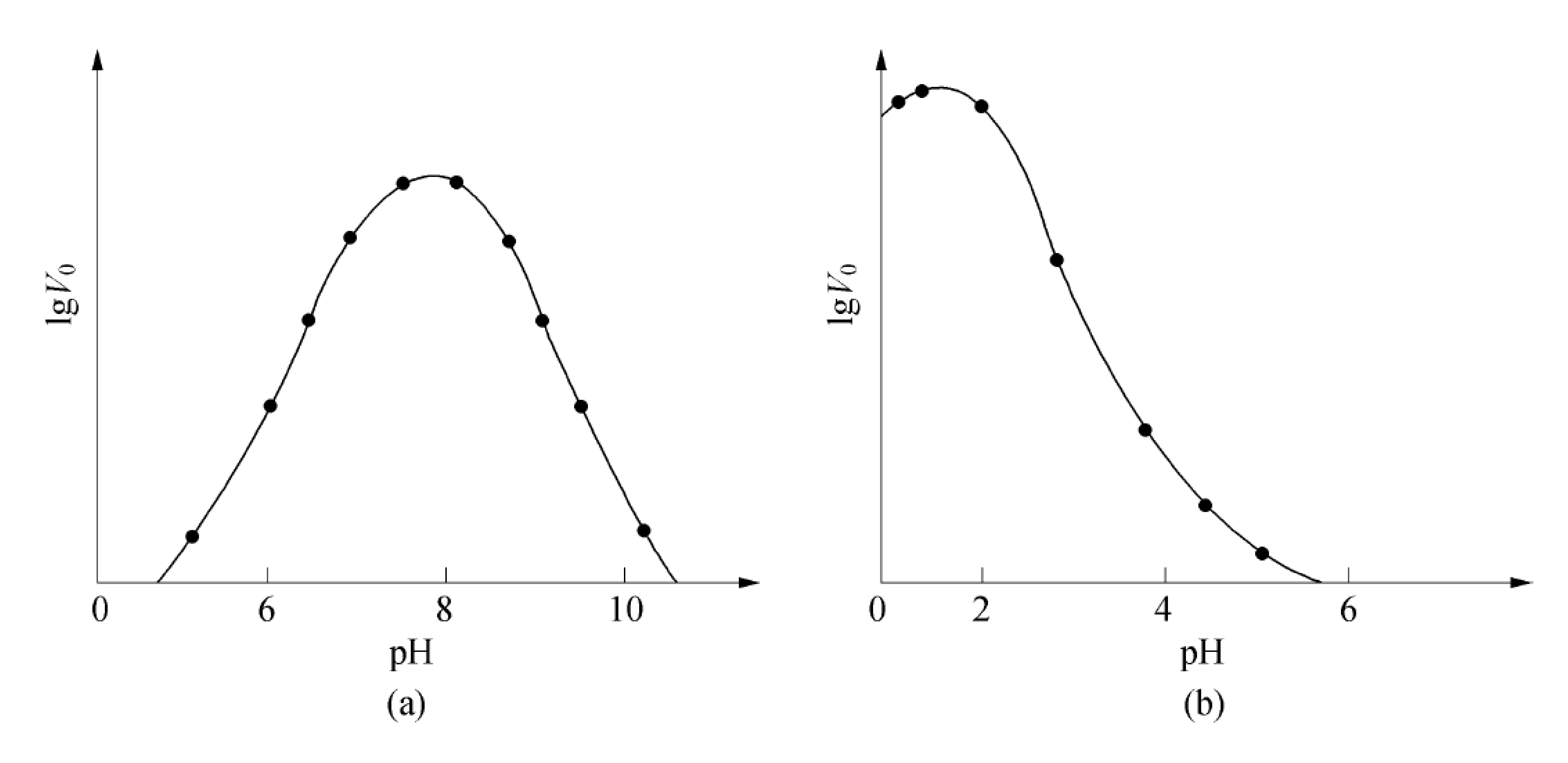


图 2-11 胃蛋白酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 pH 活性曲线

（a）葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；（b）胃蛋白酶

4. 温度对反应速度的影响 化学反应的速度随温度升高而加快。但酶是蛋白质，可随温度的升高而变性。在温度较低时，反应速度随温度升高而加快，一般地说，温度每升高 10℃，反应速度大约增加 1 倍。但温度超过一定数值后，酶受热变性的因素占优势，反应速度反而随温度上升而减缓，形成倒 V 形或倒 U 形曲线。在此曲线顶点所代表的温度，反应速度最大，称为酶的最适温度（optimum temperature）（图 2-12）。

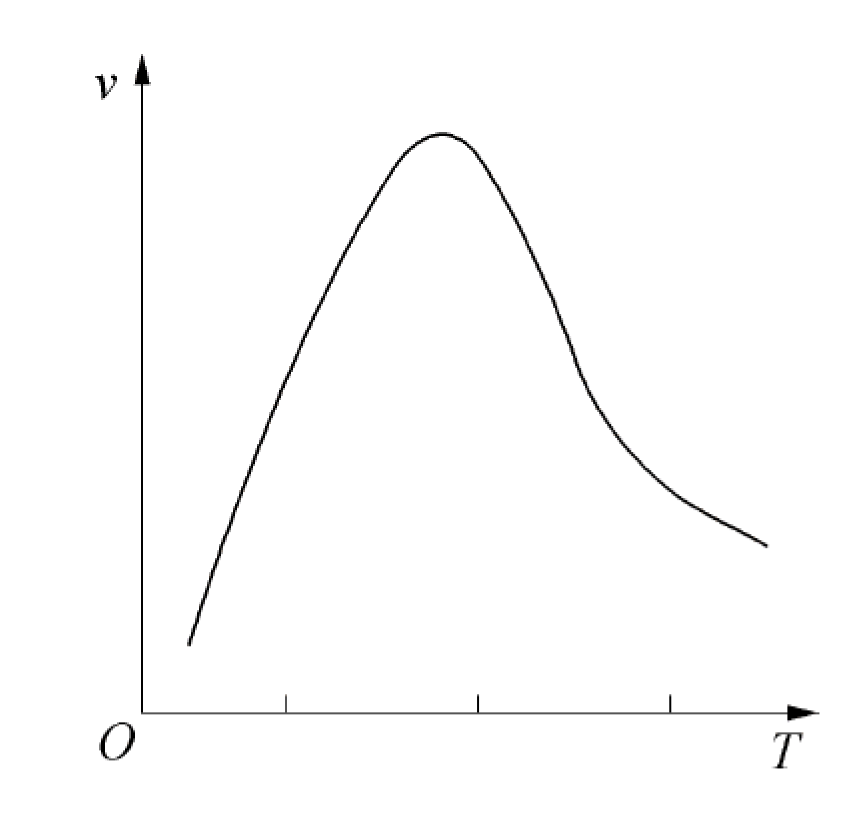


图 2-12 温度对酶促反应速度的影响

温度对酶促反应速度的影响曲线呈稍有倾斜的钟罩形，由图 2-12 可以看出：①随温度的升高，反应速度加快；②当温度达到某一特定温度时，酶活力最强，酶促反应速度最大，此时的温度称为该酶的最适温度；③在高于最适温度时，随着温度的升高，酶促反应速度反而降低。

动物体内酶的最适温度为 35～40℃，大多数酶在 60℃以上变性失活。少数酶能耐受较高的温度，如细菌淀粉酶在 93℃时活力最高，牛胰核糖核酸酶在 95℃时仍不失活。低温一般不破坏酶，温度升高，酶即可恢复活力，这就是生物制品、细菌菌种等常在低温保存的原因。

酶的最适温度同样不是酶的特征物理常数，它与底物种类、介质 pH、离子强度、保温时间等因素有关，只在一定的条件下才有意义，例如酶催化反应作用的时间越长，最适温度越低，相反，时间越短，最适温度越高。

2.2.2 多底物酶反应动力学

实际上大多数酶反应的机制是比较复杂的，一般包含有一种以上的底物，至少也是两种底物，即双底物反应：

$$A + B \xrightarrow{E} P + Q \tag{2-33}$$

目前认为大部分双底物反应可能有 3 种反应机制。

（1）依次反应机制（ordered mechanism）：有序序列的 BiBi 机制。酶必须先与底物 A 结合，然后与底物 B 结合形成三元的复合物 EAB。需要 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的脱氢酶的反应就属

此类型。用式（2-34）说明：

$$\begin{array}{ccccccccc} & A & & B & & P & & Q & \\ & \downarrow & & \downarrow & & \uparrow & & \uparrow & \\ E & \text{——} & EA & \text{——} & EAB \longleftrightarrow & EPQ & \text{——} & EQ & \longrightarrow E \end{array} \tag{2-34}$$

这种典型反应的一般形式为

$$\begin{cases} E + A \xrightleftharpoons{K_S^A} EA \\ EA + B \xrightleftharpoons{K^{AB}} EAB \\ EAB \xrightarrow{K_{cat}} E + P + Q \end{cases} \tag{2-35}$$

产物形成的速度方程、二元酶-底物复合物 EA 的平衡常数、形成三元酶底物复合物 EAB 的平衡解离常数或稳态米氏常数和酶物料平衡分别是：

$$v = K_{cat} c_{EAB} \tag{2-36}$$

$$K_S^A = \frac{c_E c_A}{c_{EA}} \tag{2-37}$$

$$K^{AB} = \frac{c_{EA} c_B}{c_{EAB}} \tag{2-38}$$

$$c_{E_T} = c_E + c_{EA} + c_{EAB} \tag{2-39}$$

式中：c_{E_T}表示总的酶浓度。

用总酶浓度对速度方程进行标准化重排后得到有序序列 BiBi 机制的速度方程（v/c_{E_T}）：

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{c_A c_B}{K_S^A K^{AB} + K^{AB} c_A + c_A c_B} \tag{2-40}$$

式中，

$$V_{max} = K_{cat} c_{E_T} \tag{2-41}$$

（2）乒乓反应机制（ping pong mechanism）：对于这个机制，酶必须首先与底物 A 结合，然后释放产物 P 并形成酶产物 E′，然后底物 B 与 E′结合，形成 E′B 复合物，复合物分解成游离酶 E 和第二个产物 Q。所以，对于乒乓机制来说，不形成三元复合物，可用式(2-42)来说明：

A　　P　B　　Q

E　(EA-E′P)　E′　(E′B-EQ)　E　　（2-42）

这种反应的一般稳态方程是：

$$\begin{cases} E + A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EA \\ EA \xrightarrow{k_2} E' + P \\ E' + B \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E'B \\ E'B \xrightarrow{k_4} E + Q \end{cases} \tag{2-43}$$

式中，$V_{max} = K_{cat} c_{E_T}$。

这个机制的速度方程、稳态的米氏常数和酶物料平衡分别是：

$$K_m^A = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{c_E c_A}{c_{EA}} \tag{2-44}$$

$$K_m^B = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} = \frac{c_{E'} c_B}{c_{E'B}} \tag{2-45}$$

$$c_{E_T} = c_E + c_{EA} + c_{E'B} + c_{E'} \tag{2-46}$$

设 E′浓度成稳定状态，则又能得到 E 和 E′之间的关系。

$$c_E = \frac{k_2}{k_4}\frac{K_m^A}{K_m^B}\frac{c_{E'} c_B}{c_A} \tag{2-47}$$

用总酶浓度对速度方程进行标准化重排后得到乒乓（BiBi）机制的速度方程（v/c_{E_T}）：

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{c_A c_B}{\left(\frac{k_4}{k_2}\right)K_m^A c_B + K_m^B c_A + \left(1 + \frac{k_4}{k_2}\right)c_A c_B} \tag{2-48}$$

式中，$V_{max} = K_{cat} c_{E_T}$，$K_{cat} = k_4$。该反应的限速步骤是 E′B 转变为 E 和 Q，即 $k_4 \ll k_2$，则式（2-48）可以简化为

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{c_A c_B}{a K_m^A c_B + K_m^B c_A + c_A c_B} \tag{2-49}$$

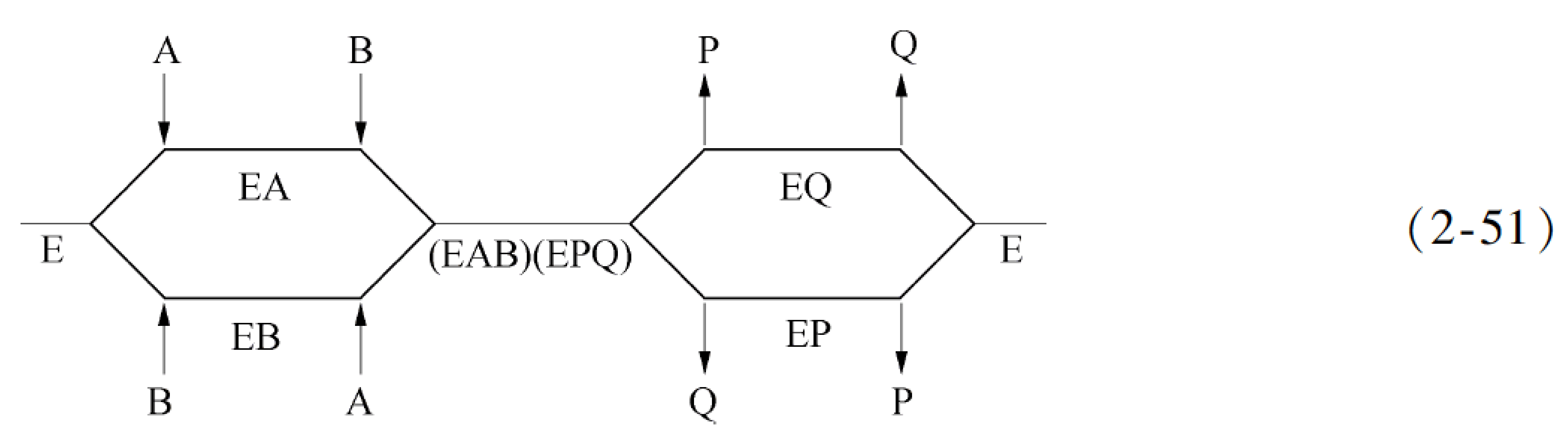
$$v = k_4 c_{E'B} \tag{2-50}$$

式中，$a = \frac{k_4}{k_2}$。

转氨酶是这种乒乓催化反应的典型。转氨酶首先与氨基酸（底物 A）作用，产生中间物 EA，然后释放出酮酸（产物 P）；其间有一个辅酶结构转变的阶段：辅酶中的磷酸吡哆醛变为磷酸吡哆胺，酶 E 转变为 E′，然后 E′再与底物 B（另一个酮酸）作用，释放出产物（相应的氨基酸）。

许多酶促反应常常是几个不同底物结合在酶分子上参与反应。例如，在己糖激酶催化的反应中，ATP 和葡萄糖是底物分子，ADP 和 6-磷酸葡萄糖是产物，这种双底物的反应速度也可用米氏方程来分析。己糖激酶对其每个底物都有一个 K_m。具有双底物的酶促反应常常包括一个底物和另一个底物间的原子或功能基团的转移。这些反应常常具有各自不同的路径。在一些反应中，两种底物在酶促反应中同时与酶分子上的特定位点结合形成非共价三元复合物。三元复合物的形成可以是底物与酶的随机结合，也可以是以一定的顺序结合。如果在第二个底物结合上去之前，第一个底物已经转化成产物并从酶上释放下来，则反应中不形成三元复合物。乒乓机制就是其中的一个例子。

（3）随机机制（random mechanism）：加入底物 A 及 B 后，产物 P 及 Q 以随机的方式释放出来。同时，底物的加入也是随机的，E 可以先和 A 结合，也可以先和 B 结合，其结果都是形成中间产物 EAB。在产物释放时，可先释放 P，也可先释放 Q。用式（2-51）来说明：



如磷酸化酶催化的反应就属此类：

$$糖原 + Pi \xrightarrow{磷酸化酶} G\text{-}1\text{-}Pi \tag{2-52}$$

2.2.3　有抑制剂的酶反应动力学

凡能与酶分子上的某些基团结合，使酶活力降低或完全丧失的物质称为酶的抑制剂（inhibitor）。

抑制剂对酶活力的抑制作用与酶变性的不同点在于以下两个方面：①抑制剂对酶有一定的选择性，一种抑制剂只能引起某一类或某几类酶的抑制；而使酶变性失活的因素，如强酸、强碱等，对酶没有选择性。②抑制剂虽然可使酶失活，但它并不明显改变酶的结构，不引起酶蛋白变性，去除抑制剂后，酶又可恢复活力。而变性因素常破坏酶分子的非共价键，部分或全部地改变酶的空间结构，从而导致酶活力的降低或丧失。

根据抑制剂与酶分子之间作用特点的不同，将抑制作用分为不可逆抑制和可逆抑制两类。

1. 不可逆抑制作用　抑制剂以共价键与酶的必需基团结合，不能用透析、超滤等物理方法解除抑制，这类抑制剂称为不可逆抑制剂，这种抑制作用称为不可逆抑制作用（irreversible inhibition）。

例一，有机磷化合物，如敌百虫等，能通过磷原子与丝氨酸羟基共价结合，从而抑制胆碱酯酶的活力，乙酰胆碱不能被失活的酶水解，结果导致乙酰胆碱在体内积聚，过多的乙酰胆碱会导致胆碱能神经过度兴奋，使昆虫由于功能失调而死亡，人和家畜产生多种严重中毒症状。与此作用机制相似的物质还有有机汞化合物、有机砷化合物、一氧化碳、氰化物等。

例二，碘代乙酸能与酶分子的巯基进行不可逆结合，巯基是多种酶的必需基团，结合后会抑制酶的活力。与此作用机制相似的物质还有某些重金属，如 Pb^{2+}、Cu^{2+}、Hg^{2+}，以及对氯汞苯甲酸等。

不可逆抑制作用随抑制剂浓度的增加、酶与抑制剂接触时间的延长而逐渐增强。不能用透析、超滤等物理方法解除抑制，但是可以通过化学反应将之除去。有机磷化合物中毒时，可用含有—CH ═NOH 基的肟化物将其从酶分子上取代下来，使酶恢复活力。这类化合物是有机磷杀虫剂的特效解毒剂。重金属中毒时可用二巯基丙醇或二巯基丁二酸钠等含巯基的化合物使酶恢复活力。

2. 可逆抑制作用　抑制剂以非共价键与酶结合，用超滤、透析等物理方法能够解除抑制，这类抑制剂称为可逆抑制剂，这种抑制作用称为可逆抑制剂作用（reversible inhibition）。可逆抑制作用的类型主要有 3 种：竞争性抑制作用、非竞争性抑制作用和反竞争性抑制作用。

可逆抑制剂与酶的结合是可逆的，抑制强度的大小取决于抑制剂与酶的相对亲和力以及抑制剂与底物浓度的相对比例。增加底物浓度可降低或解除抑制剂对酶的抑制作用。

1）竞争性抑制动力学：抑制剂的结构与底物结构相似，能与底物竞争结合在酶的活性中心，从而降低或抑制酶的活力，这种抑制剂称竞争性抑制剂，这种抑制作用称竞争性抑制作用（competitive inhibition），见图 2-13。

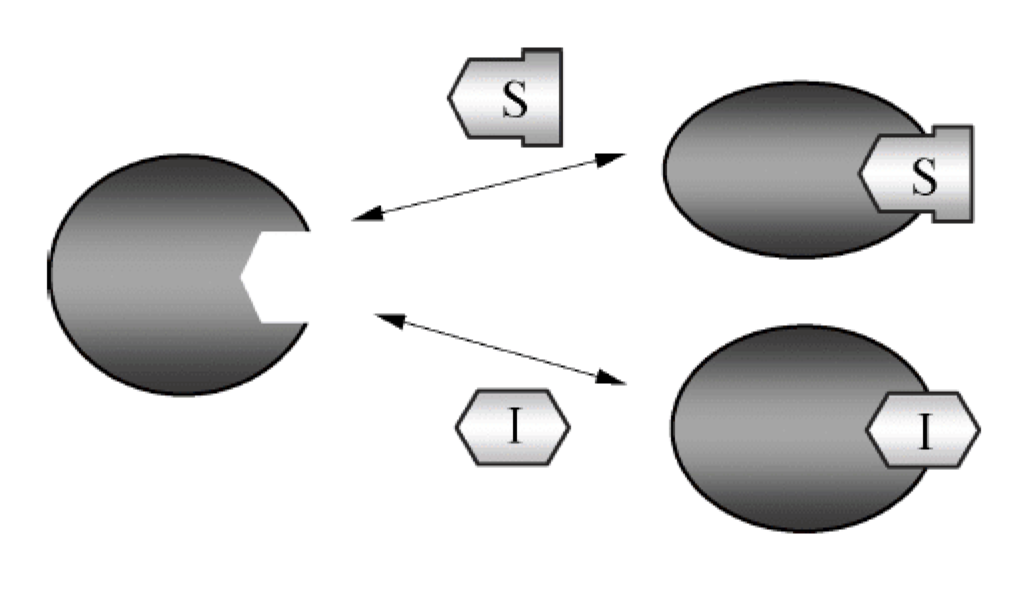


图 2-13　抑制剂和底物竞争与酶结合

S：底物；I：抑制剂

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{2-53}$$

$$E + I \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EI \tag{2-54}$$

假设酶与抑制剂的反应可迅速达到平衡：

$$k_3 c_E c_I = k_{-3} c_{EI} \tag{2-55}$$

因此：

$$c_{EI} = \frac{k_3}{k_{-3}} c_E c_I \tag{2-56}$$

根据前期米氏方程的推导，可以得出，当有抑制剂存在时：

$$v = \frac{V_{max} c_S}{c_S + K_m\left(1 + \dfrac{c_I}{K_I}\right)} \tag{2-57}$$

例一，如琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸，而丙二酸、苹果酸及草酰乙酸与琥珀酸结构相似，所以它们都可与琥珀酸脱氢酶的底物结合部位结合，抑制该酶的活力，这几种物质均是琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂。

例二，竞争性抑制作用的原理可用来阐明某些药物的作用原理和指导新药合成。某些细菌以对氨基苯甲酸、二氢蝶啶及谷氨酸为原料合成二氢叶酸，并进一步生成四氢叶酸，四氢叶酸是细菌核酸合成的辅酶。磺胺药物与对氨基苯甲酸结构相似，是细菌二氢叶酸合成酶的竞争性抑制剂。它通过降低菌体内四氢叶酸的合成能力，阻碍核酸的生物合成，抑制细菌的繁殖，达到抑菌的目的（图 2-14）。

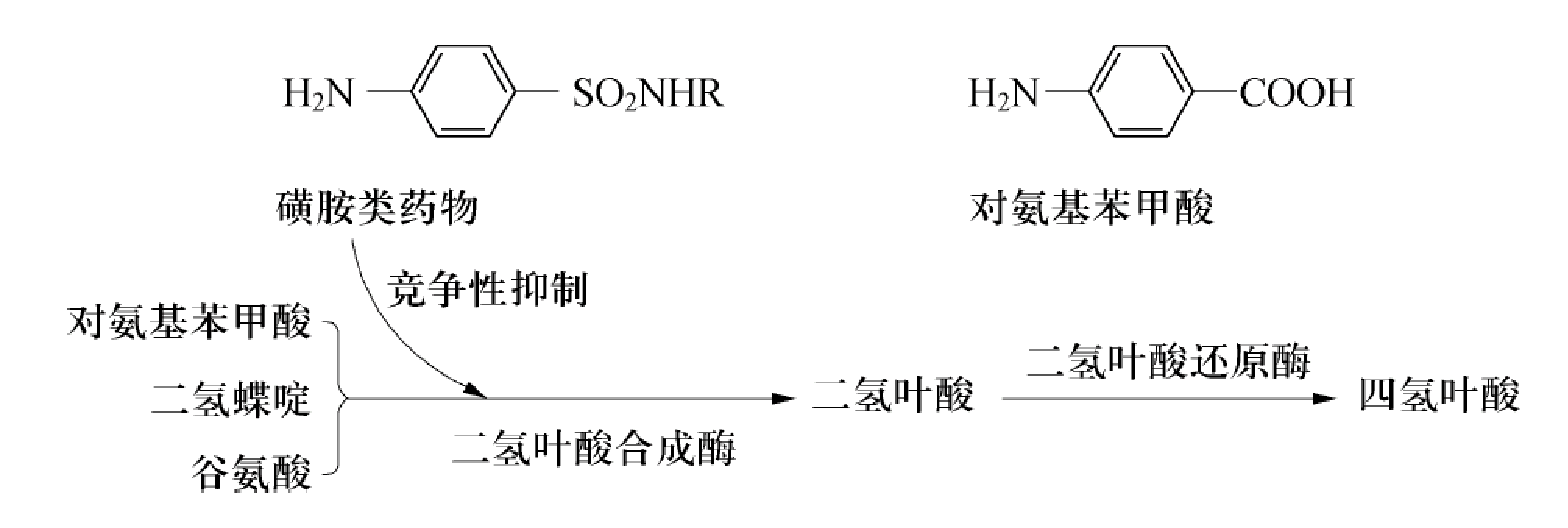


图 2-14　磺胺药物抑菌原理

氨甲蝶啶、氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤等，都是酶的竞争性抑制剂，分别抑制四氢叶酸、脱氧嘧啶核苷酸及嘌呤核苷酸的合成，从而抑制肿瘤的生长，在临床上被用做抗癌药物。

竞争性抑制作用的特征曲线如图 2-15 所示。

从图 2-15 中可看到，竞争性抑制剂使反应速率降低，K_m 值增大，但对 V_{max} 并无影响。

2）非竞争性抑制动力学：有些抑制剂可与酶活力中心以外的必需基团结合，不影响酶与底物的结合，也就是说，抑制剂和底物可同时结合在酶分子上，形成的酶 – 底物 – 抑制剂复合物（ESI），不能释放出产物，使酶活力丧失，这种抑制剂称为非竞争性抑制剂，这种抑制作用称为非竞争性抑制作用（non-competitive inhibition）（图 2-16）。

如图 2-16 所示，在非竞争性抑制作用中，抑制剂主要结合在维持酶分子构象的必需基团上或结合在活性中心的催化基团上，从而降低酶的活性。其反应速度根据前期米氏方程的推导可以得出，当有抑制剂存在时：

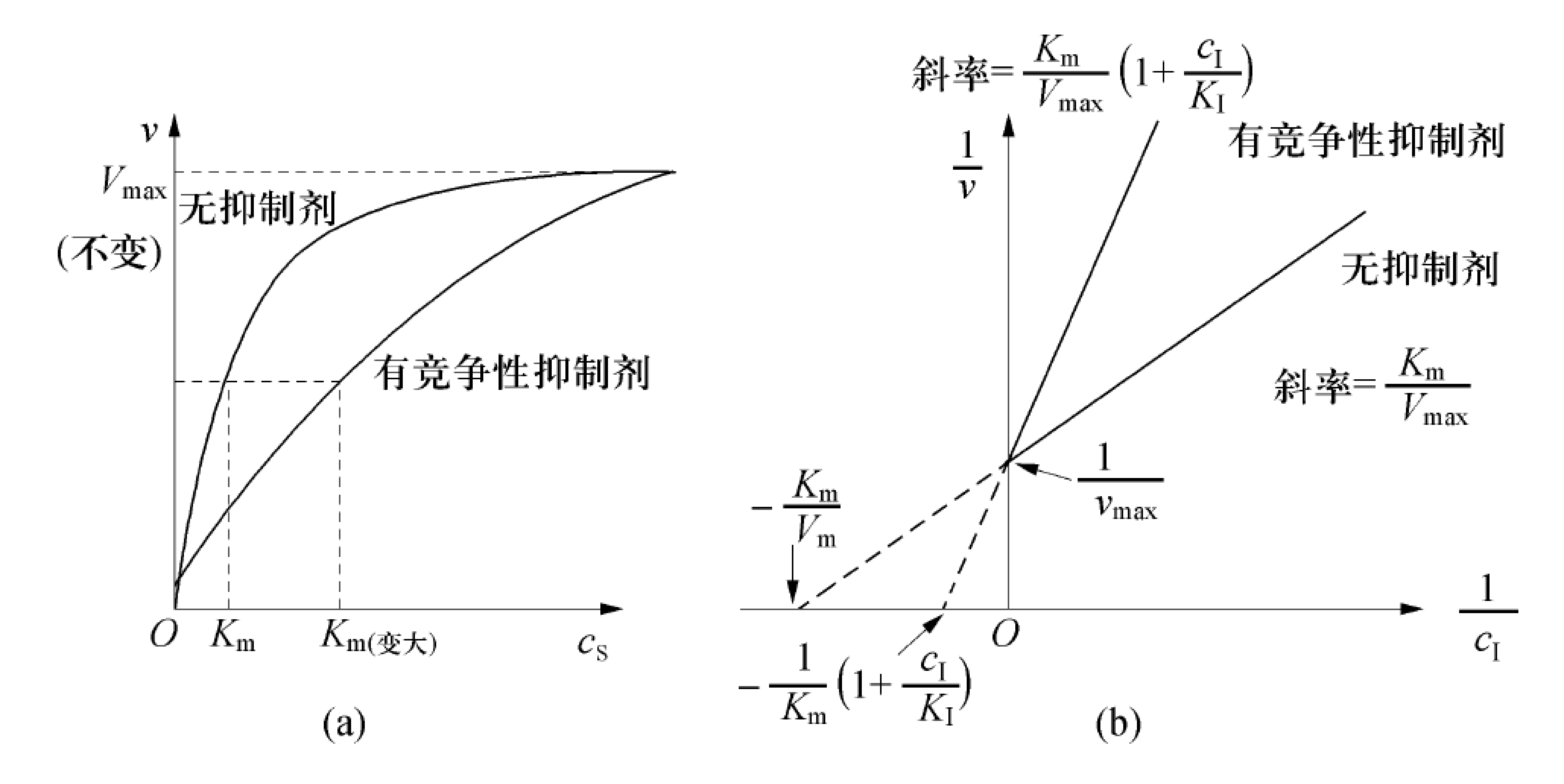


图 2-15　竞争性抑制作用动力学曲线

（a）c_S 对 v 作图；（b）双倒数作图

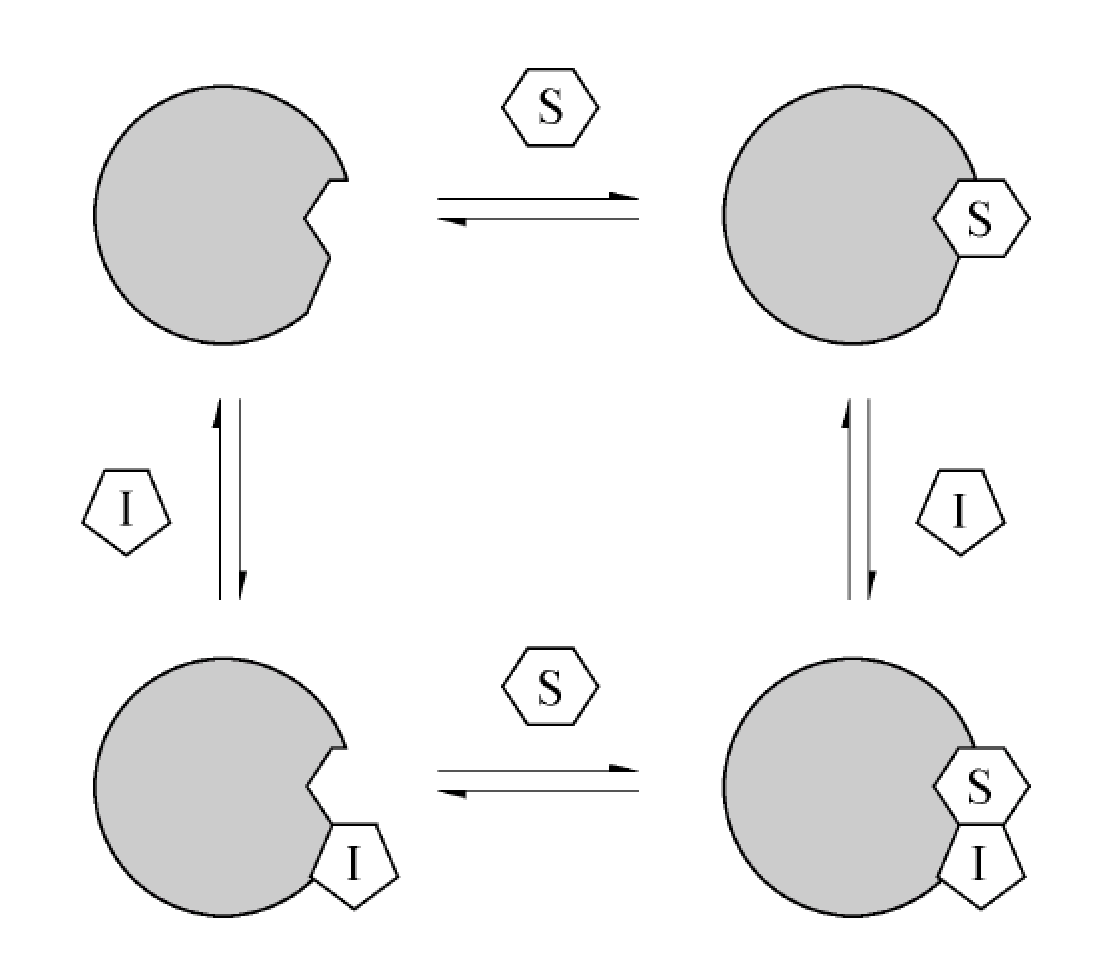


图 2-16　非竞争性抑制作用

$$v = \frac{V_{max} c_S}{\left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)(K_m + c_S)} \tag{2-58}$$

非竞争性抑制作用的特征曲线如图 2-17 所示。可以看出，非竞争性抑制剂存在的曲线与无抑制剂存在的曲线共同相交于横坐标 $-1/K_m$ 处，纵坐标截距因抑制剂的存在而变大。这说明非竞争抑制剂使反应速度降低，K_m 值不发生改变，V_{max}减小。

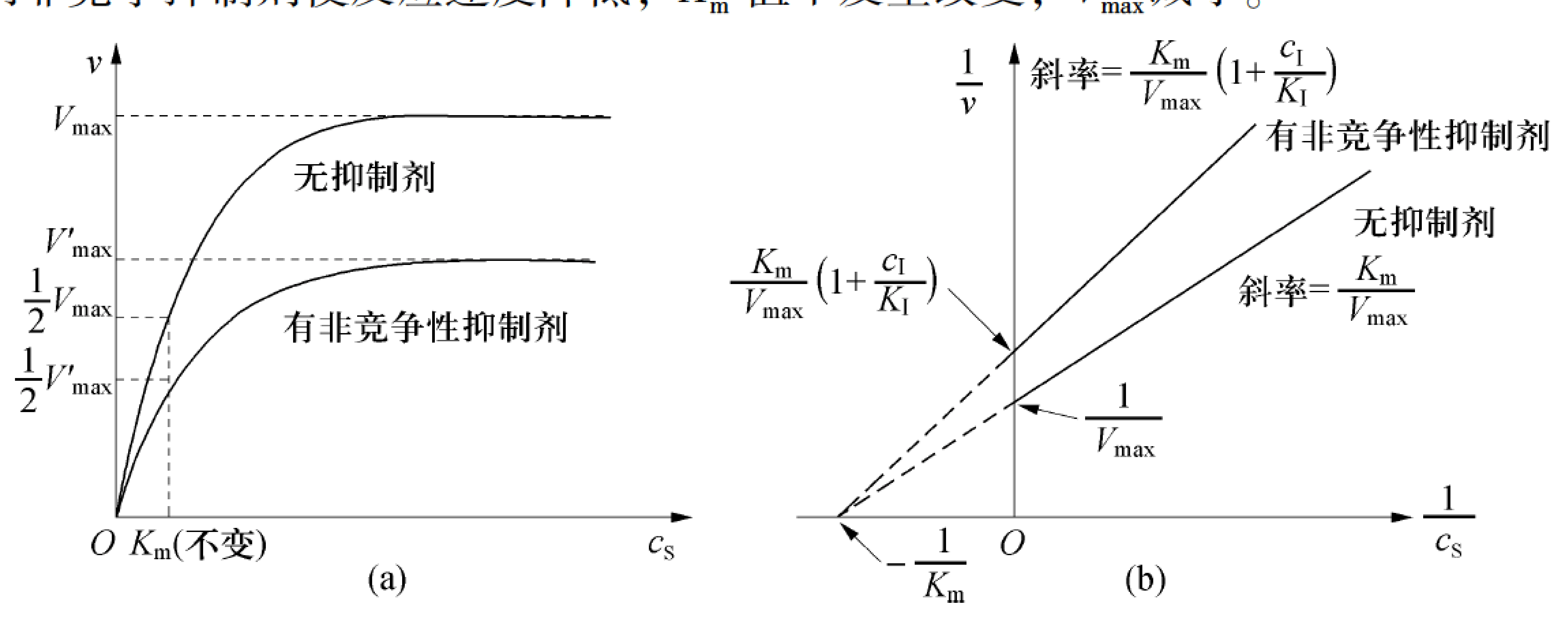


图 2-17　非竞争性抑制作用动力学曲线

（a）c_S 对 v 作图；（b）双倒数作图

3）反竞争性抑制动力学：有些抑制剂必须在酶结合了底物之后才能与酶和底物的中间产物结合，该抑制剂与单独的酶不结合，称为反竞争性抑制剂，这种抑制作用称为反竞争抑制作用（uncompetitive inhibition）。反竞争性抑制常见于多底物反应中，如肼类化合物抑制胃蛋白酶（图 2-18）。

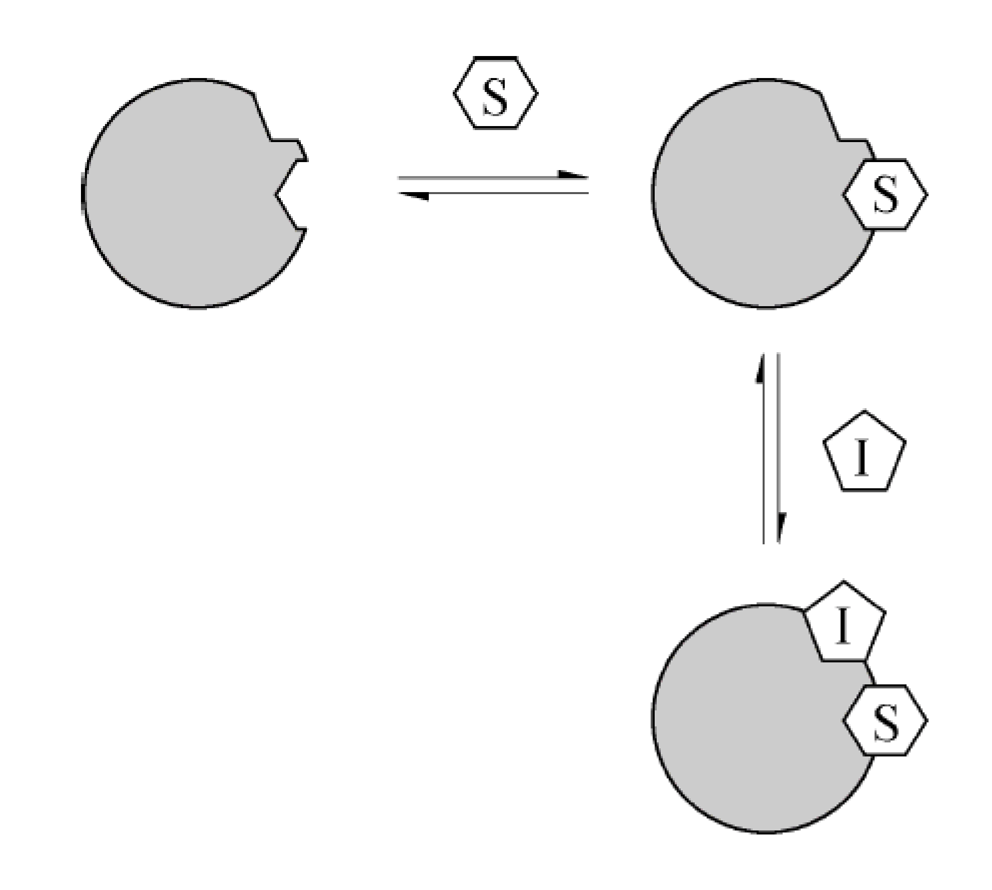


图 2-18　反竞争性抑制作用

根据前期米氏方程的推导可以得出，当有抑制剂存在时：

$$v = \frac{V_{max} c_S}{K_m + \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) c_S} \qquad (2\text{-}59)$$

反竞争性抑制作用的特征曲线如图 2-19 所示。可以看出，反竞争性抑制剂存在使反应速度降低，K_m 值和 V_{max} 都减小。

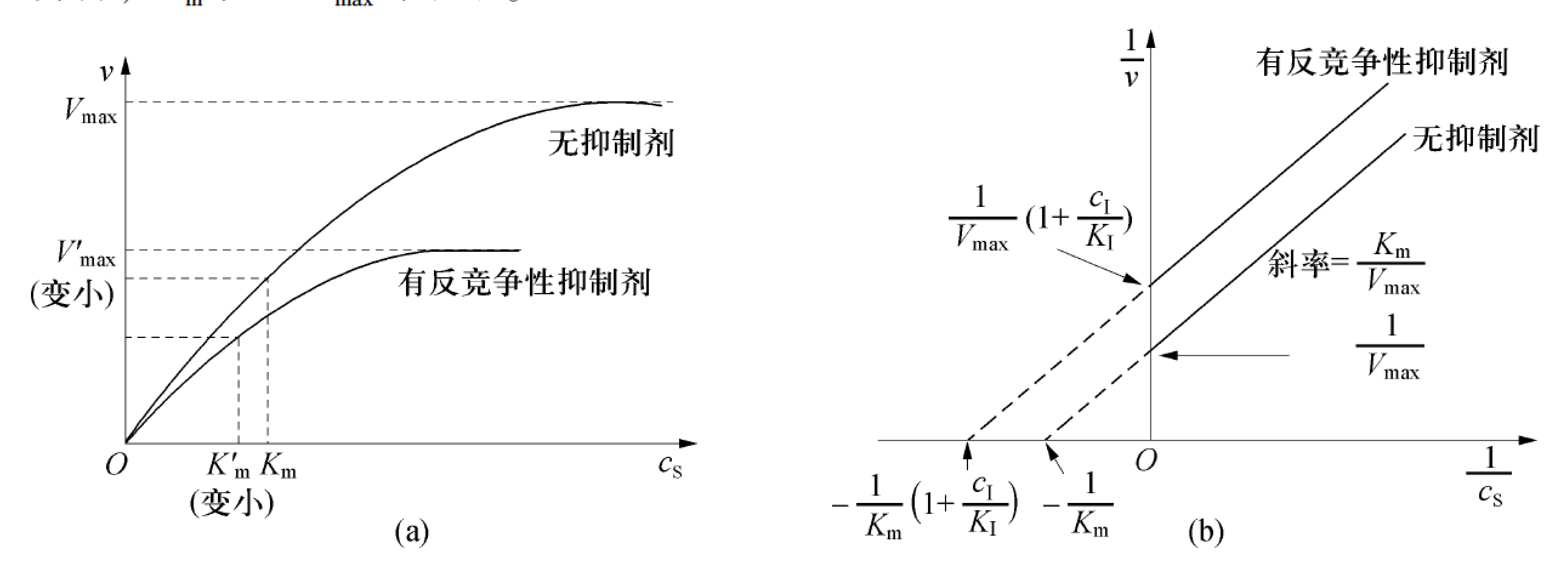


图 2-19　反竞争性抑制作用动力学曲线

（a）c_S 对 v 作图；（b）双倒数作图

表 2-4 对比了可逆反应中 3 种抑制剂类型对酶反应动力学及动力学参数的影响。

表 2-4　不同抑制剂对米氏方程及米氏常数等的影响

抑制剂类型	反应速率方程式	K_m	V_{max}
无抑制剂	$v = \frac{V_{max} c_S}{K_m + c_S}$	K_m	V_{max}
竞争性抑制剂	$v = \frac{V_{max} c_S}{\left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) K_m + c_S}$	$K_m \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)$ 减小	V_{max}
非竞争性抑制剂	$v = \frac{V_{max} c_S}{\left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)(K_m + c_S)}$	K_m	$V_{max} / \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)$ 减小
反竞争性抑制	$v = \frac{V_{max} c_S}{K_m + \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) c_S}$	$K_m / \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)$ 减小	$V_{max} / \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)$ 减小
K_I 酶抑制剂解离常数 $K_I = c_E c_I / c_{EI}$			

2.2.4　激活剂对酶促反应速度的影响

凡能使酶由无活力变为有活力或使酶活力提高的物质，统称为激活剂（activator）。

激活剂的种类很多，从无机离子到高分子有机化合物，如 DNA 聚合酶、已糖激酶、磷酸果糖激酶等催化反应时都需要有 Mg^{2+} 存在，而 Cl^- 可提高唾液淀粉酶的活力，某些有机小分子，如抗坏血酸、半胱氨酸、还原型谷胱甘肽等对巯基酶有激活作用，可以使二硫键打开，恢复酶的催化活性。

乙二胺四乙酸（EDTA）能去除重金属离子对酶的抑制作用。这类能去除抑制剂的物质也可称为激活剂。激活剂的作用是相对的，一种酶的激活剂对另一种酶来说，也可能是一种抑制剂。不同浓度的激活剂对酶活力的影响也不相同，往往是在低浓度下起激活作用，高浓度下则产生抑制作用。

2.2.5　固定化酶反应动力学

酶的催化作用具有高选择性、高催化活性、反应条件温和、环保无污染等特点，但游离状态的酶对热、强酸、强碱、高离子强度、有机溶剂等稳定性较差，易失活，并且反应后混入催化产物等物质，纯化困难，不能重复使用。为了克服这些问题，20 世纪 60 年代酶固定化技术应运而生。它是模拟体内酶的作用方式（体内酶多与膜类物质相结合并进行特有的催化反应），通过化学或物理的手段，用载体将酶束缚或限制在一定的区域内，使酶分子在此区域进行特有和活跃的催化作用，并可回收及长时间重复使用的一种交叉学科技术。

固定化酶（immobilized enzyme）这个术语是在 1971 年酶工程会议上被推荐使用的。Trevan 在 1980 年给出了固定化酶的定义：酶的固定化就是通过某些方法将酶与载体相结合后使其不溶于含有底物的相中，从而使酶被集中或限制在一定的空间范围内进行酶解反应。其实，固定化酶并不是新的物质，例如，胞内酶是在细胞内起作用的，类似于用包埋方法制成的固定化酶。因此，固定化酶研究一定程度上可以认为是为了使酶在更接近其原始状态下进行的反应。对各种酶的固定化技术进行积极的研究与开发始于 20 世纪 50 年代，通过重氮化共价结合法将羧肽酶、淀粉酶、胃蛋白酶等固定在聚氨基苯乙烯树脂上；1963 年，利用聚丙烯酰胺包埋法固定了多种酶；1969 年，日本的一家制药公司首次将固定化的酰化氨基酸水解酶用来从混合氨基酸中生产 *L*-氨基酸，开辟了固定化酶工业化应用的新纪元。

固定化酶与游离酶相比的主要优点是：极易将固定化酶与底物、产物分开；可以在较长时间内进行反复分批反应和装柱连续反应，在大多数情况下，能够提高酶的稳定性；酶反应过程能够加以严格控制；反应产物溶液中没有酶的残留，简化了提纯工艺；较游离酶更适合于多酶反应；可以增加产物的回收率，提高产物的质量；酶的使用效率提高，成本降低。与此同时，固定化酶也存在一些缺点：固定化时，酶活力有损失；固定化酶增加了生产的成本，工厂初始投资大；固定化酶只能用于可溶性底物，而且较适用于小分子底物，对大分子底物则不适用；与完整菌体相比，不适用于多酶反应，特别是需要辅助因子的反应；胞内酶必须经过酶的分离手续。

酶的固定化，不仅使酶的活力发生了变化，而且由于固定化酶的引入，反应体系变成为多相体系，例如液－固体系、气－液－固体系等。因此在研究固定化酶催化反应动力学时，不仅要考虑催化反应的本征动力学规律，更要研究反应物的质量传递规律，要研究物质的质量传递对酶催化反应过程的影响。建立其同时包括物质传递速率和催化反应速率的动力学方

程。这种方程一般称为宏观动力学方程。它是设计固定化酶反应器和确定其操作条件的理论基础，也是本节的重点。

2.3　固定化酶的性质

2.3.1　酶的固定化方法

酶的固定化方法很多，但对任何酶都适用的方法是没有的。游离酶经过固定化后变为固定化酶，其性质将发生很大的变化，这种变化很复杂，常因酶的种类、所催化的反应、所用的载体和采用的固定化方法不同而异。酶的固定化方法按用于结合的化学反应的类型进行分类，包括物理结合法、化学结合法和包埋法。另外，还发展出一些更新的固定化方法（图 2-20）。

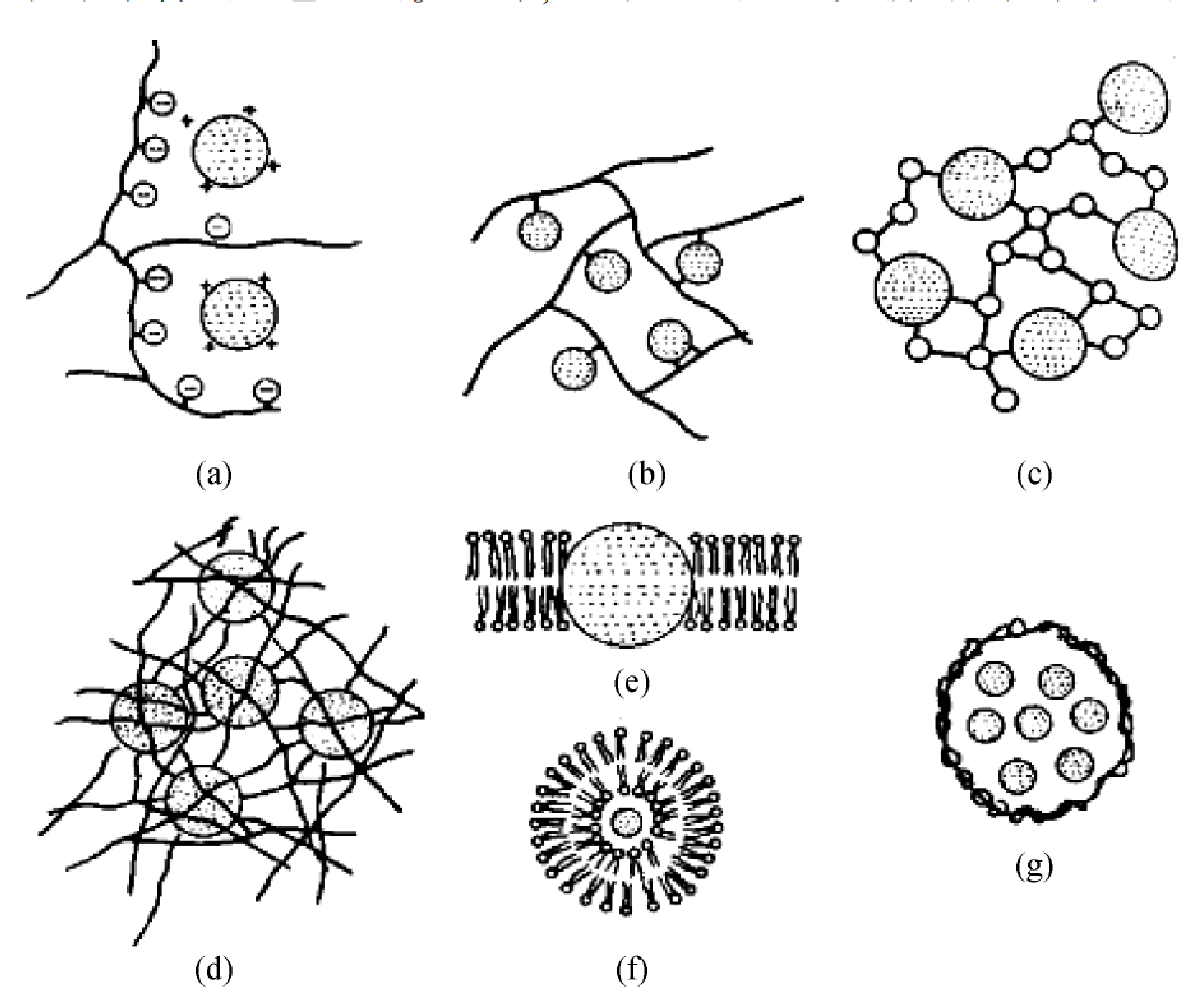


图 2-20　固定化酶的模式

（a）离子结合；（b）共价结合；（c）交联；
（d）聚合物包埋；（e）疏水作用；（f）脂质体包埋；（g）微胶囊

1. 物理结合法

（1）结晶法：就是使酶结晶从而实现固定化的方法。对于晶体来说，载体就是酶蛋白本身。它提供了非常高的酶浓度。对于活力较低的酶来说，这一点就更具优越性。酶的活力低不仅限制了固定化技术的运用，而且当酶的活力低时，通常使用酶的费用较昂贵。当提高酶的浓度时，就提高了单位体积的活力，并因此缩短了反应时间。但是这种方法也存在局限性：在不断的重复循环中，酶会有损耗，从而使得固定化酶浓度降低。

（2）分散法：就是通过酶分散于水不溶相中从而实现固定化的方法。对于在水不溶的有机相中进行的反应，最简单的固定化方法是将干粉悬浮于溶剂中，并且可以通过离心的方法将酶进行分离和再利用。然而，如果酶分布不好，将引起传质现象。导致活力低的一个原因是目前还没有完善的酶粉末的保存体系。比如酶由于潮湿和反应产生的水使储存的冻干粉变得发黏并使酶的颗粒较大。另外，在有机溶剂中，酶的构象和稳定性也能影响其活力。对于

用在有机溶剂中的固定化酶，有许多途径可以提高它们的反应速率：①正确的体系和储存状态使酶粉末充分分散，有助于提高活力；②与亲脂化合物的共价连接能增加酶在有机相中的溶解度。

（3）吸附法：是酶被物理吸附于水不溶性载体上的一种固定化方法。此类载体很多，可分为无机载体和有机载体两大类。常用的无机载体有活性炭、多孔玻璃、多孔陶瓷、酸性白土、漂白土、硅胶、膨润土、金属氧化物等，有机载体有淀粉、谷蛋白、纤维素及其衍生物、甲壳素及其衍生物等。物理吸附法具有酶活力中心不易被破坏和酶高级结构变化少的优点，因而酶活力损失很少。若能找到适当的载体，这是一种很好的方法，但是它有酶与载体相互间作用力弱、酶易脱落等缺点。

（4）离子结合法：是将酶与含有离子交换基团的水不溶性载体以静电作用力相互结合的固定化方法。常用的阴离子交换剂载体有 DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶等；阳离子交换剂载体有 CM-纤维素、IRC-50、CG-50 等。离子结合法的优点是操作简单，操作条件温和，酶的高级结构和活性中心的氨基酸不易被破坏，能得到酶活力回收率较高的固定化酶；缺点是载体和酶的结合力较弱，容易受缓冲溶液的种类或 pH 的影响，在离子强度高的条件下反应时，酶往往会从载体上脱落。

2. 化学结合法

（1）共价结合法：是将酶与聚合物载体以共价键结合的固定化方法。此法研究较为成熟。与载体共价结合的酶的功能基团包括：氨基、羧基、酚基、巯基、羟基、咪唑基等。参与共价结合的氨基酸残基不应是酶催化活性所必需的，否则，往往会造成固定化后的酶活力完全丧失。共价结合法与物理吸附法相比，其优点是酶与载体结合牢固，一般不会因底物浓度高或存在盐类等原因而轻易脱落。但是该方法要求的反应条件苛刻，操作复杂，而且由于采用了比较激烈的反应条件，会引起酶蛋白高级结构变化，破坏部分活性中心，因此往往不能得到比活力高的固定化酶，酶活力回收率一般为 30% 左右，甚至底物的专一性等酶的性质也会发生变化，并且制备过程繁杂。

（2）交联法：是通过双功能或多功能基试剂与酶分子之间进行分子交联的固定化方法。此法与共价结合法一样，也是利用共价键固定化酶，所不同的是它不使用载体。这种方法是通过双功能或多功能试剂在酶分子之间形成共价键，把酶蛋白分子彼此交联起来，形成立体化网状结构的固定化酶。这种聚集体完全不溶于水，并且不需要使用载体。

交联使用的试剂可以是具有两种相同的功能基团（均一双功能试剂），或具有两种或两种以上不同功能基团（杂或非均一多功能试剂）。后者在将酶结合到不溶性载体上的应用要比在分子间交联反应中使用得更普遍。经常使用的试剂有以下几种：①通过与赖氨酸残基形成希夫碱的戊二醛；②通过重氮耦联反应与 *L*-赖氨酸、*L*-半胱氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-组氨酸、*L*-精氨酸残基反应形成酰胺键（肽键）的异氰酸酯；③发生重氮耦合反应的双重氮联苯胺等。其中戊二醛是目前最广泛使用的交联剂之一。蛋白质由戊二醛形成的交联网络经常是不可逆的，并且能够经受得住 pH 或温度的剧烈变化。但这种方法的缺点是，反应条件比较剧烈，酶活力较低，很少单独使用。如果能降低交联剂浓度和缩短反应时间，将有利于固定化酶活力的提高。

3. 包埋法　包埋固定化方法是把酶定位于聚合物材料或膜的格子结构中（多孔载体）有限的空间内。酶在该空间内的行动受到限制，不能随意地离开而进入周围介质中，这样可防止酶蛋白的释放，但底物和产物则能自由地进入这个空间。包埋法一般不需要与酶蛋白的

氨基酸残基进行结合反应，很少改变酶的高级结构，酶活力回收率较高，可用于包埋各种酶、微生物细胞和具有不同大小、不同性质的细胞器。但是在包埋时发生化学聚合反应，酶容易失活，必须巧妙设计反应条件。由于只有小分子可以通过网格扩散，并且这种扩散阻力还会导致固定化酶动力学行为的改变，降低酶活力，因此包埋法只适合作用于小分子底物和产物的酶，对于那些作用于大分子底物和产物的酶是不适合的。

包埋法一般可分为网格型和微囊型两种。将酶包埋于高分子凝胶细微网格内的称为网格型；将酶包埋在高分子半透膜中的称为微囊型。

（1）网格型：用于此法的高分子化合物有聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和光敏树脂等高分子化合物，以及淀粉、明胶、卡拉胶、胶原、大豆蛋白、壳聚糖、海藻酸钠等天然高分子化合物。前一类常采用在酶存在下聚合合成高分子的单体或预聚物的方法，后一类常采用溶胶状天然高分子物质在酶存在下凝胶化的方法。大多数酶可以采用这种方法进行固定。

（2）微囊型：将酶包在直径为几微米到几百微米的球型半透聚合物膜内即形成微胶囊化酶。这种固定化的酶是用物理方法包埋在膜内的，只要底物和产物分子的大小能够通过半透膜，底物和产物分子就能够自由扩散通过膜。这种包埋法的主要优点是：使用较小的体积就可以为酶与底物的接触提供极大的表面积；有可能用简单的步骤将多种酶同时固定。但在微胶囊化过程中，用这种固定化方法，酶偶尔可能失活，需要高浓度的酶，所用的某些微胶囊化方法有可能使酶组合在膜壁上，在使用中会有酶漏出。制备微囊型固定化酶常用的方法有以下几种：①界面沉淀法。利用某些高聚物在水相和有机相的界面上溶解度极低而形成皮膜将酶包埋的原理。一般是先将含高浓度血红蛋白的酶溶液在与水不互溶的有机相中乳化，在油溶性的表面活性剂存在下形成油包水型微滴，再将溶于有机溶剂的高聚物加入乳化液中，然后加入一种不溶解高聚物的有机溶剂，使高聚物在油－水界面上沉淀析出，形成膜，将酶包埋，最后在乳化剂的帮助下由有机相移入水相。此法条件温和，酶不易失活，但要完全除去膜上残留的有机溶剂很困难。作为膜材料的高聚物有硝酸纤维素、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等。②界面聚合法。这是利用界面聚合的原理用亲水性单体和疏水性单体将酶包埋于半穿透性聚合体中的方法。具体方法是：将酶的水溶液和亲水单体用一种与水不相溶的有机溶剂制成乳化液，再将溶于同一有机溶剂的疏水单体溶液，在搅拌下加入上述乳化液中；在乳化液中的水相和有机溶剂之间发生聚合反应，水相中的酶即包埋于聚合体膜内。该法制备的微囊大小能通过调节乳化剂浓度和乳化时的搅拌速度而自由控制，制备过程所需时间非常短。但在包埋过程中由于发生化学反应而会引起某些酶失活。③二级乳化法。将一种聚合物溶于一种沸点低于水，且与水不混溶的溶剂中，加入酶的水溶液，并用油溶性表面活性剂为乳化剂，制成第一个乳化液。此乳化液属于“油包水”型，把它分散于含有保护性胶质（如明胶、聚丙烯醇和表面活性剂）的水溶液中，形成第二个乳化液。不断搅拌，低温（真空）蒸出有机溶剂，便得到含酶的微囊。常用的高聚物有乙基纤维素、聚苯乙烯等，常用有机溶剂为苯、环己烷和氯仿。此法制备比较容易，酶几乎不失活，但残留的有机溶剂难以完全除尽，而且膜也比较厚，会影响底物扩散。④脂质体包埋法。是近年来研制成功的一种新微囊法，其基本原理是利用表面活性剂和卵磷脂等形成液膜而将酶包埋。其显著特征是底物或产物的膜透过性不依赖于膜孔径的大小，而只依赖于膜成分的溶解度，因此，可以加快底物透过膜的速度。

（3）其他包埋方法：如辐射包埋法，酶溶解在纯单体水溶液、单体加聚物水溶液或纯聚合物水溶液中，在低温或常温下，用 γ 射线、X 射线或电子束进行辐射，可以得到包埋有酶

的亲水凝胶。如 γ 射线引发丙烯醛与聚乙烯膜接枝聚合后，活性醛基可共价固定化葡萄糖氧化酶并呈现良好结果。

4. 固定化酶的其他方法

（1）磁性高分子微球固定化酶：磁性高分子微球指内部含有磁性金属或金属氧化物的超细粉末而具有磁响应性的高分子微球。它是近 20 年发展起来的一种新型功能高分子材料。磁性高分子微球既可以通过共聚、表面改性等化学反应在微球表面引入多种反应性功能基团，也可通过共价键来结合酶、细胞、抗体等生物活性物质，在外加磁场的作用下，进行加速反应或分离，因而在生物工程、生物医学及细胞学等领域有着广阔的前景。在固定化酶体系中，可以用磁性高分子微球作为结合酶的载体。

与非磁性微球相比，磁性高分子微球作为酶固定化载体，具有以下优点：①有利于固定化酶从反应体系中分离和回收，操作简单；②对于双酶反应体系，当一种酶失活较快时，就可以用磁性材料来固载另一种酶，回收后反复使用，降低成本；③磁性载体固定化酶放入磁性稳定的流动床反应器中，可以减少持续反应体系中的操作，适合于大规模连续化操作；④利用外部磁场可以控制磁性材料固定化酶的运动方式和方向，替代传统的机械搅拌方式，提高固定化酶的催化效率；⑤可以改善酶的生物相容性、免疫活性、亲疏水性；⑥提高酶的稳定性。

（2）超声波固定化酶：利用超声波使高分子主链均裂产生自由引发功能性单体后，再聚合成嵌段共聚物载体，用此载体固定化酶，因此，借助现代技术可使一般性聚合物经功能化改性成为新的酶固定化载体。超声波方法在克服加热反应或放热反应可能导致酶及细胞活性下降方面有良好效果，固定化反应不仅可在温和条件下进行，且随反应温度降低而加速反应。一些实验研究结果表明：在超声波作用下，酶主链肽键亦可均裂成大分子自由基。大多数酶的溶液经超声波处理后仅部分失活，有少数酶完全不失活。增大酶浓度，加入可保护酶活力性位点的抑制剂，或在反应器中充入某气体（如氢气）等可避免或减少酶的超声失活。

（3）热处理法固定化酶：将含酶细胞在一定温度下加热处理一段时间使酶固定在菌体内而制备得到固定化菌体。热处理法只适用于那些热稳定性较好的酶的固定化。在加热处理时，要严格控制好加热温度和时间，以免引起酶的变性失活。例如，将培养好的含葡萄糖异构酶的链霉菌细胞在 60 ~ 65℃ 的温度下处理 15min，葡萄糖异构酶全部固定在菌体内。热处理法也可与交联法或其他固定化法联合使用，进行双重固定化。

（4）等离子体技术固定化酶：等离子体技术可使载体单位面积固定化酶的量增大，提高酶结合率。

2.3.2　固定化对酶性质的影响

1. 固定化后酶活力的变化　固定化酶的活力在多数情况下比天然酶小。在同一测定条件下，固定化酶的活力要低于等摩尔原酶的活力的原因可能是：酶分子在固定化过程中，空间构象会有所变化，甚至影响了活性中心的氨基酸；固定化后，酶分子空间自由度受到限制（空间位阻），会直接影响活性中心对底物的定位作用；内扩散阻力使底物分子与活性中心的接近受阻；包埋时，酶被高分子物质半透膜包围，不能透过膜与酶接近。不过也有个别情况，酶在固定化后反而比原酶活力提高，原因可能是耦联过程中得到化学修饰，或固定化过程提高了酶的稳定性。

2. 固定化对酶稳定性的影响　酶的稳定性包括酶对各种试剂的稳定性（包括蛋白质变性剂、抑制剂等）、对蛋白酶的稳定性、对热的稳定性、不同 pH（酸度）稳定性、储存稳

定性、操作稳定性等。固定化酶的稳定性一般都比游离酶好。固定化酶的稳定性的提高对其实际应用是非常有利的，尤其是酶的热稳定性，因为酶的热失活发生在高温条件下，是酶失活的最主要的原因。稳定性是关系到固定化酶能否实际应用的大问题，在大多数情况下，酶经过固定化后，其稳定性都有所增加，这是十分有利的。

首先，固定化酶热稳定性提高。作为生物催化剂，酶也和普通化学催化剂一样，温度越高，反应速度越快。但是，酶是一种蛋白质，一般对热不稳定。因此，实际上不能在高温条件下进行反应，而固定化酶耐热性提高，使酶最适温度提高，酶催化反应能在较高温度下进行，加快反应速度，提高酶作用效率。例如，将巨大芽孢杆菌青霉素酰化酶连接到聚丙烯腈纤维载体上，制成固定化青霉素酰化酶，发现固定化酶的热稳定性优于游离酶。其次，对各种有机试剂及酶抑制剂的稳定性提高。提高固定化酶对各种有机溶剂的稳定性，使本来不能在有机溶剂中进行的酶反应成为可能。

此外，固定化酶对不同 pH 稳定性、对蛋白酶稳定性、储存稳定性和操作稳定性都有影响。据报道，有些固定化酶经过储藏，可以提高其活性。

固定化酶稳定性提高的原因可能有以下几点：①固定化后酶分子与载体多点连接，可防止酶分子伸展变形；②酶活力的缓慢释放；③抑制酶的自降解，将酶与固态载体结合后，由于酶失去了分子间相互作用的机会，从而抑制了降解。

3. 固定化酶的最适温度变化 酶反应的最适温度是酶热稳定性与反应速度综合的结果。酶催化反应都存在一个最佳反应温度，在此温度下进行酶的催化反应，速度最快，高于或低于此温度，反应速度都会有所减慢。酶的最佳反应温度不是酶的特征物理常数，酶经固定化后，大多数情况下，其最佳反应温度会提高，这是因为酶分子固定化后，活力较游离酶的活力降低得缓慢，因而可在较高的温度下获得最快的反应速度。酶的最佳反应速度的增加在实际应用中具有重要的意义。

4. 固定化酶的最适 pH 变化 酶固定化后的最佳反应 pH 会发生不同程度的变化，可能有以下三个方面的原因：①酶本身电荷在固定化前后发生变化。②载体电荷性质的影响致使固定化酶分子内、外扩散层的 H^+ 浓度产生差异，如用带负电荷载体制备的固定化酶，其最适 pH 较游离酶偏高，这是由于这类载体会吸引溶液中的阳离子，包括 H^+，使其附着在载体表面，结果使固定化酶扩散层 H^+ 浓度比周围的外部溶液高，即偏酸性，这样外部溶液中的 pH 必须向碱性偏移，才能抵消微环境作用，使其表现出酶的最大活力。反之，使用带正电荷的载体，其最适 pH 向酸性偏移。③酶催化反应导致固定化酶分子内部形成带电荷微环境。

5. 固定化酶的米氏常数（K_m）变化 固定化酶的 K_m 随载体的带电性能变化。当酶结合于电中性载体时，由于扩散限制造成表观 K_m 上升，可是带电载体和底物之间的静电作用会引起底物分子在扩散层和整个溶液之间不均一分布。由于静电作用，与载体电荷性质相反的底物在固定化酶微环境中的浓度比整体溶液的高。与游离酶相比，固定化酶即使在底物浓度较低时，也可达到最大反应速度；而载体与底物电荷相同，就会造成固定化酶的表观 K_m 显著增加。简单地说，由于高级结构变化及载体影响引起酶与底物亲和力变化，从而使 K_m 变化。这种 K_m 变化又受溶液中离子强度影响：离子强度增加，载体周围的静电梯度逐渐减小，K_m 变化也逐渐缩小以至消失。

6. 固定化酶的底物专一性 酶经固定化后，其底物专一性的变化一般有以下两种情况：当酶的底物为大分子化合物时，由于酶经固定化后立体障碍显著增加，大分子底物与酶分子的接触受到阻碍，酶的催化活力难以发挥出来，催化活性大大下降；而当酶的底物为小分子

化合物时，酶经固定化后，载体与底物之间的立体障碍较小，酶分子与小分子底物的接触较容易，在大多数情况下，底物的专一性不发生变化。

2.3.3 影响固定化酶促反应的主要因素

1. 空间效应

（1）构象效应：指在固定化过程中，酶和载体的相互作用引起酶的活性部位发生某种扭曲变形，改变了酶活力部位的三维结构，引起酶分子活性中心或调节中心的构象发生变化，导致酶与底物的结合力下降（图 2-21）。

（2）位阻效应：由于载体的遮蔽作用或固定化方法不当，给酶的活性中心或调节中心造成空间障碍，使底物和酶无法与酶接触（图 2-21）。

（3）微扰效应：由于载体的亲水性、疏水性、介电常数等，使酶所处的微环境与宏观环境不同，从而改变了酶的催化能力或酶对效应物的调节能力（图 2-22）。

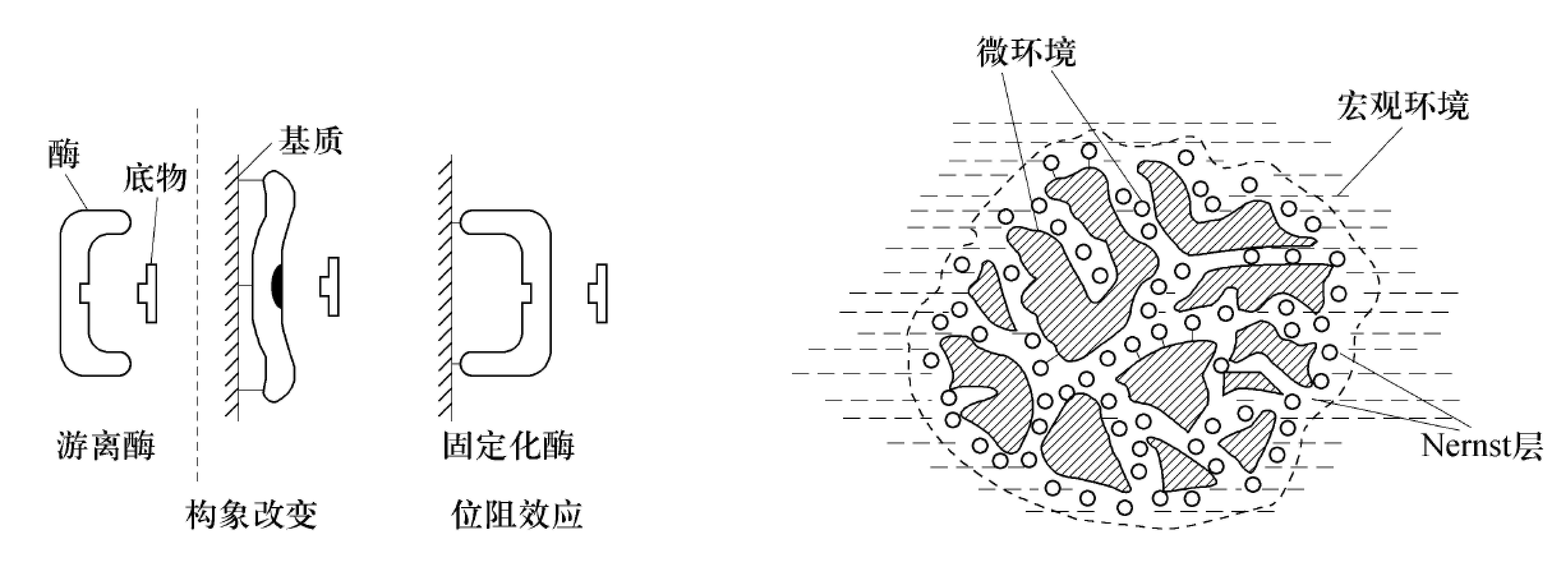


图 2-21　固定化酶的构象改变与位阻效应

图 2-22　固定化酶的微环境与宏观环境

2. 分配效应　当固定化酶处在反应体系的主体溶液中时，反应体系成为固液非均相体系。分配效应是由于固定化酶的载体与底物之间亲水性、疏水性及静电作用等引起固定化酶载体内部底物或产物浓度与溶液主体浓度不同，微环境和宏观环境之间物质的不等分配，从而影响酶促反应速率的一种效应。分配效应可用分配系数 K_p 定量描述。

微环境指在固定化酶附近的局部环境，而宏观环境指主体溶液。分配系数（K_p）定义为载体内、外底物（或其他物质）浓度之比。K_p 的测定：在已知底物浓度（c_{S_0}）、体积（V_0）的溶液中，放入不含底物的一定体积的载体，并保持适宜条件，当达到平衡时，测定载体外溶液的底物浓度（c_S）后计算载体内、外底物浓度的比值。

3. 扩散效应　由于底物、产物或其他效应物的迁移和传递速度所受到的限制，当物质扩散系数很低，酶活力较高时，在固定化周围形成浓度梯度，造成微观环境和宏观环境间底物、产物浓度产生差别。固定化酶对底物进行催化反应时，底物必须从主体溶液传递到固定化酶内部的催化活性中心处，反应得到的产物又必须从酶催化活性中心传递到主体溶液中。扩散限制效应可分为外扩散限制效应和内扩散限制效应。

（1）外扩散：底物从液相主体向固定化酶的外表面的一种扩散，或是产物从固定化酶的外表面向液相主体中的扩散。

（2）内扩散：指对一有微孔载体的固定化酶，其底物从固定化酶外表面扩散到微孔内部的酶催化中心处，或是产物沿着相反途径的扩散。图 2-23 形象地表示了一球形固定化酶颗粒内、外扩散特征及其浓度分布。可以看出，由于扩散限制效应的存在，底物浓度从液相主

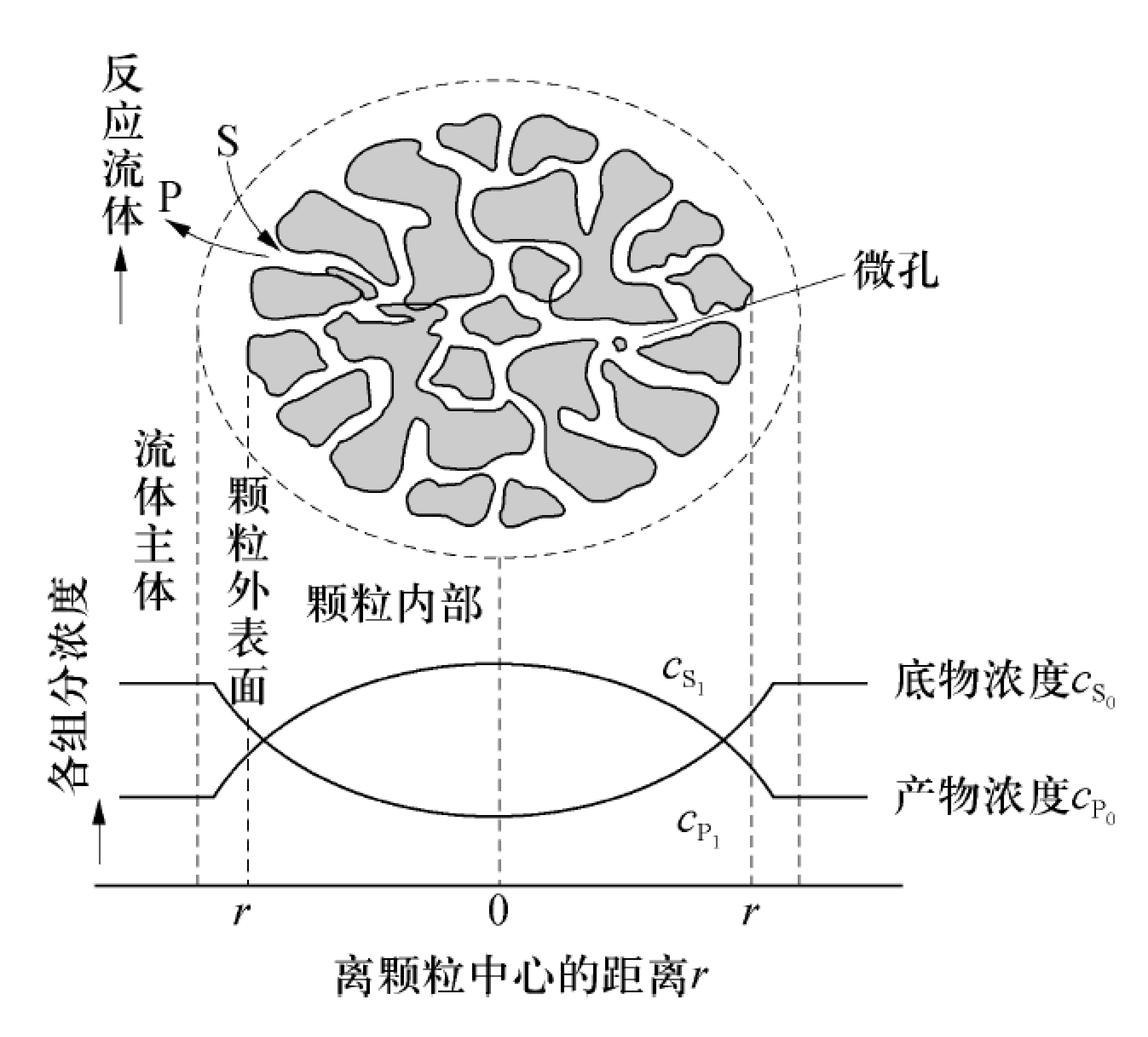


图 2-23　固定化酶载体内及其周围的物质传递及浓度分布（没有分配效应）

体到固定化酶外表面，再到内表面是依次降低的，而产物浓度分布则与此相反。

对固定化酶动力学，不仅要考虑固定化酶本身的活性变化，而且还要考虑到底物等物质的传质速率影响。因此对一个实为非均相（液－固）体系所建立的宏观动力学方程不仅要包括酶的催化反应速率，还要包括传质速率。不同因素对酶动力学影响结果见图 2-24。

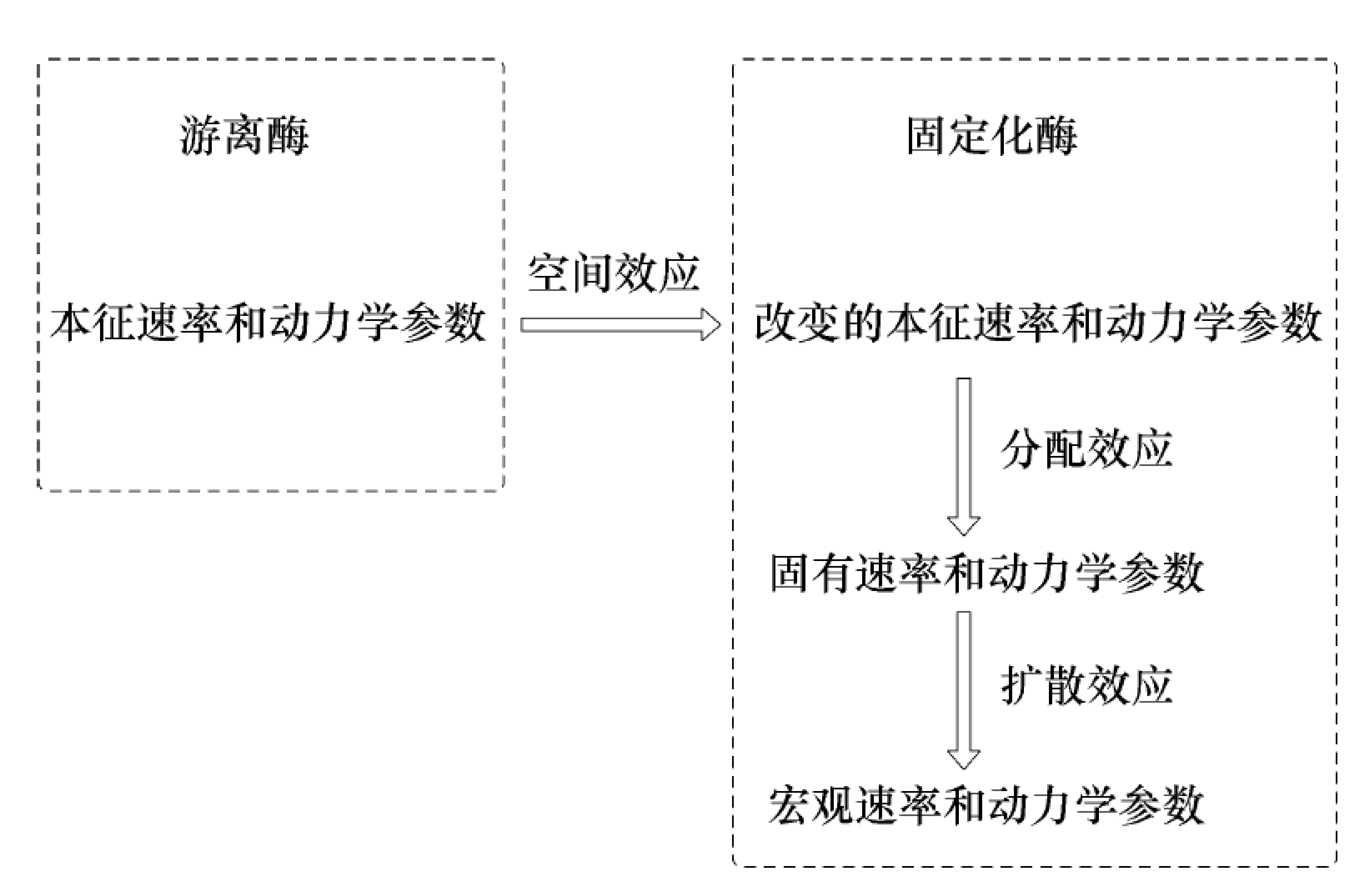


图 2-24　不同因素对酶动力学的影响

2.3.4　酶固定化的效率评价

1. 固定化酶的活力和比活力　固定化酶通常呈颗粒状，一般用于测定游离酶活力的方法改进后才能用于测定固定化酶。固定化酶的比活用每克干固定化酶所具有的酶活力单位或单位面积的酶活力单位表示（酶膜、酶管、酶板）。

2. 操作半衰期　固定化酶的操作半衰期指连续测活条件下固定化酶活力下降为最初活力一半所需要的时间（$t_{1/2}$），是衡量固定化酶稳定性的重要指标。如果固定化酶的动力学仍服从米氏方程，则可以通过米氏常数的大小来反映酶固定化前、后活力的变化。大多数酶固定化后，其 K_m 值增加，表示催化反应活力将下降。也有少数酶固定化后活力无

变化，甚至有所增加。这种活力变化可用下述两种指标来衡量：酶结合效率和酶活力回收率。

3. 酶结合效率　指实际测定的固定化酶总活力与被固定化的酶在游离状态时的总活力之比。

$$\text{酶结合效率} = \frac{\text{加入的总酶活力} - \text{未结合的酶活力}}{\text{加入的总酶活力}} \times 100\%$$

4. 酶活力回收率　指实际测定的固定化酶总活力与固定化时所用到的全部游离酶的活力之比，或称耦联效率、活力保留百分数。这两种指标的差别在于是否考虑了所剩余的未被固定化的酶。

$$\text{酶活力回收率} = \frac{\text{固定化酶活力}}{\text{被固定化游离酶的活力}} \times 100\%$$

5. 相对酶活力　指具有相同酶蛋白（或 RNA）量的固定化酶活力与游离酶活力的比值。

2.3.5　固定化酶促反应过程分析

催化反应的一般历程：气 – 固相表面催化反应是一个多步骤的过程，至少要经历五个步骤：①反应物从液相向固体催化剂表面扩散；②反应物被催化剂表面吸附；③反应物在催化剂表面上进行化学反应并生成产物；④产物从催化剂表面脱附；⑤脱附的产物从催化剂表面向液相扩散。其中，①和⑤为扩散过程，②和④为吸附和脱附过程，③是表面化学反应过程。每一步都有各自的动力学规律，总的催化反应速率由最慢的步骤确定。如果反应系统的液流足够大而催化剂的颗粒度又足够小，则可以忽略扩散作用的影响；如果反应物的吸附和产物的脱附也很快达到平衡，则该多相催化反应的速率就只由第三步即表面化学反应的速率所决定。这里只讨论表面反应为控制步骤的情况。

1. 外部扩散过程　当固定化酶促反应受外部扩散限制时，固定化酶表面处底物浓度 c_{SS} 小于主体溶液底物浓度 c_S，因此固定化酶促反应速率 r_{out} 小于未固定化时的酶促反应速率 r_o。根据酶催化反应动力学，有

$$r_{out} = \frac{r_{max} c_{SS}}{K_m + c_{SS}} \tag{2-60}$$

$$r_o = \frac{r_{max} c_S}{K_m + c_S} \tag{2-61}$$

$c_S \gg K_m$ 时，$r_{out} \approx r_o$。

以表面固定化酶为例，主体溶液底物浓度为 c_S，载体外表面底物浓度为 c_{SS}。

对外扩散过程进行分析，外扩散速率

$$N = k_L a(c_S - c_{SS}) \tag{2-62}$$

$$N_{max} = k_L a c_S \tag{2-63}$$

达到平衡时，$N = r_{out}$，即

$$\frac{r_{max} c_{SS}}{K_m + c_{SS}} = k_L a(c_S - c_{SS}) \tag{2-64}$$

由式（2-64）可唯一确定 c_{SS}。c_{SS} 也可用图解法确定（图 2-25）。$r \sim c_S$ 曲线与 $N \sim c_S$ 曲线交点即为（c_{SS}，r_{out}）。

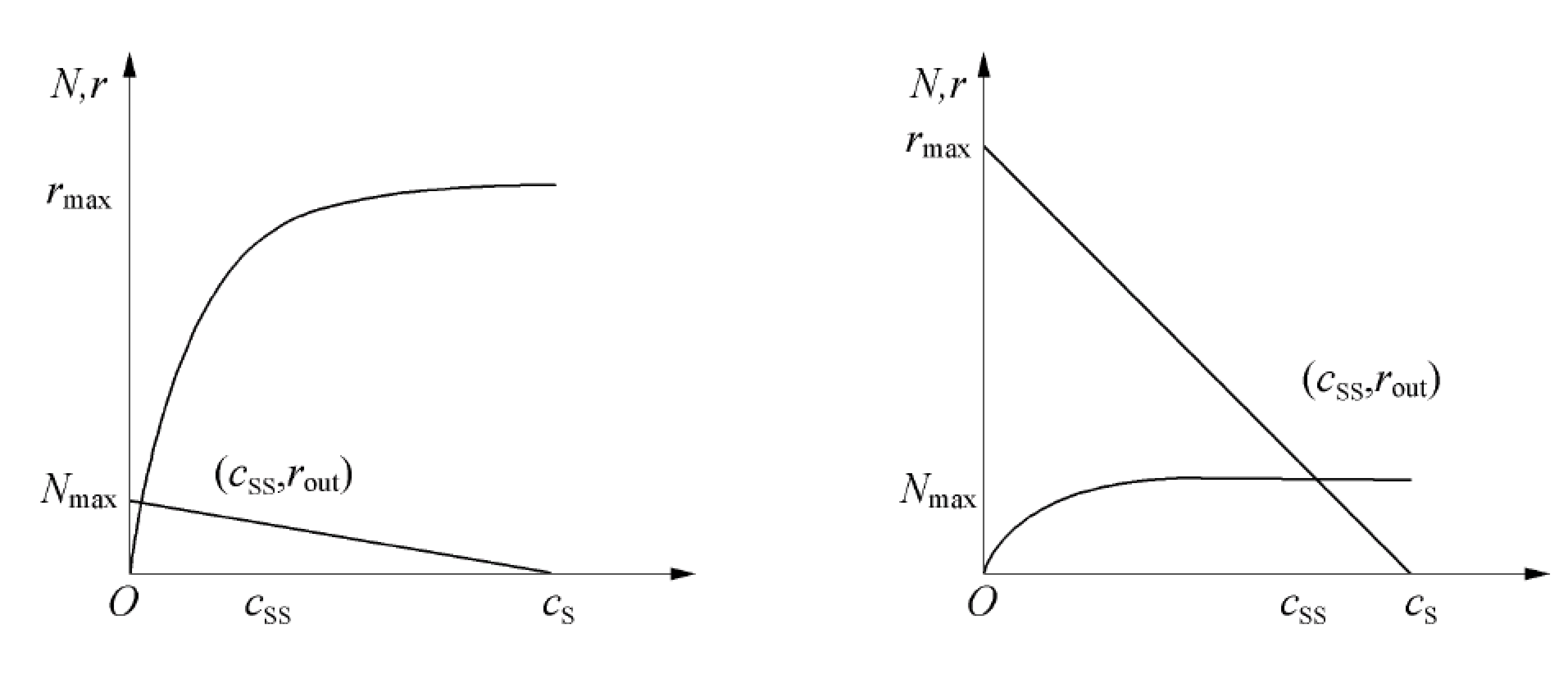


图 2-25　图解法求固定化酶表面底物浓度

用外扩散效率因子 η_{out} 表示外扩散对固定化酶促反应的影响。记作：

$$\eta_{out} = \frac{r_{out}}{r_o} \tag{2-65}$$

可见，只要确定了固定化酶表面浓度 c_{SS}，即可计算外扩散效率因子 η_{out}。从图 2-25 可以看出：

当 $r_{max} \gg N_{max}$ 时，$c_{SS} \to 0$，$\eta_{out} \to 0$；

当 $r_{max} \ll N_{max}$ 时，$c_{SS} \to c_S$，$\eta_{out} \to 1$。

Da 是固定化酶催化反应外扩散效应影响的主要判断依据，Da 为丹克莱尔（Damkohler）准数，为无因次量，是最大反应速率和最大传质速率的比值。

$$Da = \frac{r_{max}}{N_{max}} = \frac{r_{max}}{k_L a c_S} \tag{2-66}$$

令 $c^* = \dfrac{c_{SS}}{c_S}, K = \dfrac{K_m}{c_S}$，代入式（2-66）整理得

$$Da = \frac{(1 - c^*)(K + c^*)}{c^*} \tag{2-67}$$

表明 c^* 为准数 Da 的函数，即

$$c^* = f(Da) \tag{2-68}$$

当 $Da \gg 1$ 时，$c_{SS} \to 0$，$\eta_{out} \to 0$，过程为外扩散控制。

当 $Da \ll 1$ 时，$c_{SS} \to c_S$，$\eta_{out} \to 1$，过程为反应控制。

将 c^* 代入式（2-65）得

$$\eta_{out} = \frac{r_{out}}{r_o} = \frac{\dfrac{r_{max} c_{SS}}{K_m + c_{SS}}}{\dfrac{r_{max} c_S}{K_m + c_S}} = \frac{c_{SS}}{K_m + c_{SS}} = \frac{c^*}{K + c^*} \tag{2-69}$$

（$c_S \gg K_m$ 时，$r_o = r_{max}$）表明 η_{out} 为 c^* 的函数，即 $\eta_{out} = g(c^*)$。

可见，Da 准数是决定效率因子 η_{out} 和比浓度 c^* 的唯一参数，因而是表征传质过程对反应速率影响的基本准数。Da 准数越小，固定化酶表面浓度越接近于主体浓度 c_S，越接近于 1。Da 准数越大，固定化酶表面浓度越趋近于零，η_{out} 越小，η_{out} 越趋近于零。

为提高固定化酶外扩散效率，应设法减小 Da 准数。由公式（2-66）可以看出减小 Da 准数的措施：①降低固定化酶颗粒的粒径，增大比表面积，但由于粒径减小会伴随压降增

加，因此应用中要综合考虑，确定合适的粒径。②使固定化酶表面流体处于湍流状态以增大 k_L。

2. 内部扩散过程　具有大量内孔的球形固定化颗粒内部是酶促反应的主要场所。底物通过孔口向内扩散，达到不同深度，产物沿反方向从内部向孔口扩散。颗粒内部各点处底物和产物浓度不同，导致各处的反应速率的差异。内扩散效率因子 η_{in} 的定义为单位时间内颗粒内部实际酶促反应速率 r_{in} 与按颗粒外表面底物浓度计算而得到的反应速率 r_o 之比。记作：

$$\eta_{in} = \frac{r_{in}}{r_o} \tag{2-70}$$

为获得固定化酶颗粒内部实际反应速率 r_{in}，首先需要确定颗粒内部底物浓度分布。

对多孔球形固定化酶颗粒内的物料衡算：设球形固定化颗粒半径为 R，在距中心处为 r 处取一厚度为 $\mathrm{d}r$ 的微元壳体，在微元壳体内，底物浓度为 c_{Sr}，稳定状态下，对底物 S 进行物料衡算：流入量 − 流出量 = 反应量，即：

$$4\pi(r+\mathrm{d}r)^2 D_e\left(\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_{r+\mathrm{d}r} - 4\pi r^2 D_e\left(\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_r = 4\pi r^2 r_S \mathrm{d}r \quad (D_e\ \text{表示扩散系数}) \tag{2-71}$$

整理，得

$$4\pi r^2 D_e\left[\left(\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_{r+\mathrm{d}r} - \left(\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_r\right] + 8\pi r \mathrm{d}r D_e\left(\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_{r+\mathrm{d}r} = 4\pi r^2 r_S \mathrm{d}r \tag{2-72}$$

两侧同除以 $4\pi r^2 De\mathrm{d}r$ 得

$$\frac{\mathrm{d}^2 c_{Sr}}{\mathrm{d}r^2} + \frac{2}{r}\cdot\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r} = \frac{r_S}{D_e} \tag{2-73}$$

当酶促反应符合米氏方程规律时，在微元壳体内，$r_S = \dfrac{r_{max}c_{Sr}}{K_m + c_{Sr}}$，故

$$\frac{\mathrm{d}^2 c_{Sr}}{\mathrm{d}r^2} + \frac{2}{r}\frac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r} = \frac{r_{max}c_{Sr}}{D_e(K_m + c_{Sr})} \tag{2-74}$$

令 $c_X = \dfrac{c_{Sr}}{c_{SS}}$，$l = \dfrac{r}{R}$，$\beta = \dfrac{c_{SS}}{K_m}$，则

$$\varphi^2 = \frac{R^2 r_{max}}{9D_e K_m} \tag{2-75}$$

式中，φ 为西勒准数，φ 的物理意义是表面反应速率与内扩散速率之比。对各类反应动力学与固定化酶的形状，普遍化的 φ 的定义式为

$$\varphi = \frac{V_P}{A_P}\frac{r_S}{\sqrt{2}}\left(\int_{c_{S,eq}}^{c_{SS}} D_e r_S \mathrm{d}c_S\right)^{-\frac{1}{2}} \tag{2-76}$$

式（2-76）可转化为无因次形式，得

$$\frac{\mathrm{d}^2 c_X}{\mathrm{d}l^2} + \frac{2}{l}\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}l} = 9\varphi^2\frac{c_X}{1 + c_X\beta} \tag{2-77}$$

边界条件：$l = 0$，$\dfrac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}l} = 0$，$l = 1$，$c_X = 1$，该微分方程无解析解，只能用数值法求解。

$$\eta_{in} = \frac{r_{in}}{r_o} = \frac{4\pi R^2 D_e\left(\dfrac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_{r=R}}{\dfrac{4}{3}\pi R^3\dfrac{r_{max}c_{SS}}{K_m + c_{SS}}} = \frac{3}{R}\cdot\frac{D_e\left(\dfrac{\mathrm{d}c_{Sr}}{\mathrm{d}r}\right)_{r=R}}{\dfrac{r_{max}c_{SS}}{K_m + c_{SS}}} \tag{2-78}$$

引入无因次参数，则

$$\eta_{in} = \frac{\left(\frac{dc_X}{dl}\right)_{l=1}}{3\varphi^2\left(\frac{1}{1+\beta}\right)} \tag{2-79}$$

η_{in} 无解析解，只有数值解。

内扩散效率因子 η_{in}是 φ 和 β 的函数。β 对 η_{in}影响不大，影响 η_{in}的主要参数是西勒准数 φ。如果 $\varphi \ll 0.3$，则 η_{in}不随 φ 变化，近似等于 1，也就是说没有内部传质阻力，若 $\varphi \gg 0.3$，则 $\eta_{in} > 1$，反应为内扩散所限制。为提高固定化酶内扩散效率，应设法减小 φ。减小 φ 的措施主要是适当降低固定化酶颗粒粒径。表 2-5 比较了外扩散和内扩散过程。

表 2-5　外扩散过程与内扩散过程的比较

外扩散过程	内扩散过程
Da 准数是决定外扩散效率因子的唯一参数	φ 准数是决定内扩散效率因子的主要参数
Da 准数定义：$Da = \frac{r_{max}}{k_L a c_S}$	西勒准数定义：$\varphi = \frac{V_P}{A_P} \cdot \frac{r_S}{\sqrt{2}}\left(\int_{c_{S,eq}}^{c_{SS}} D_e r_S dc_S\right)^{-\frac{1}{2}}$
外扩散效率因子定义：$\eta_{out} = \frac{r_{out}}{r_o}$	内扩散效率因子定义：$\eta_{in} = \frac{r_{in}}{r_o}$
$Da < 1$，过程为反应控制，Da 准数越小，η_{out}越接近 1；$Da > 1$，过程为外扩散控制，Da 准数越大，η_{out}越趋近于零	$\varphi < 0.3$ 时，$\eta_{in} \approx 1$，过程为反应控制 $\varphi > 0.3$ 时，$\eta_{in} < 1$，过程为内扩散控制

2.4　酶的失活动力学

酶是一种不稳定的物质，常因温度、pH 等因素的影响而产生不可逆的活力下降。一般胞外酶较为稳定，而胞内酶在外部环境中容易失活。酶在保存和参与反应时均可能失活。酶在保存过程中的失活又称为酶的稳定性，失活越快，说明酶的稳定性越低。在使用时酶的失活规律对于酶催化反应过程的设计和控制都是十分重要的。其中酶的热失活，或称为热变性是最重要的一种酶失活形式。下面主要讨论此种失活的动力学。

2.4.1　未反应时的热失活动力学

了解未反应时酶的热失活动力学关系到酶的保存。测定酶未反应时的热失活动力学的方法，是在一定条件下，使酶溶液恒温保持一定的时间，然后在最适宜的 pH 和温度下测定残存的酶活力，即残存酶活力。在不同温度下反复测定，即可得到一条曲线。该曲线可以表示的酶失活特性，称为酶的热失活曲线。若改变保温时间，则会得到不同的热失活曲线（图 2-26）。

如要了解酶在未反应时的失活速率，可将残存的酶活力对其失活时间作图，则又可得到一条曲线（图 2-27）。

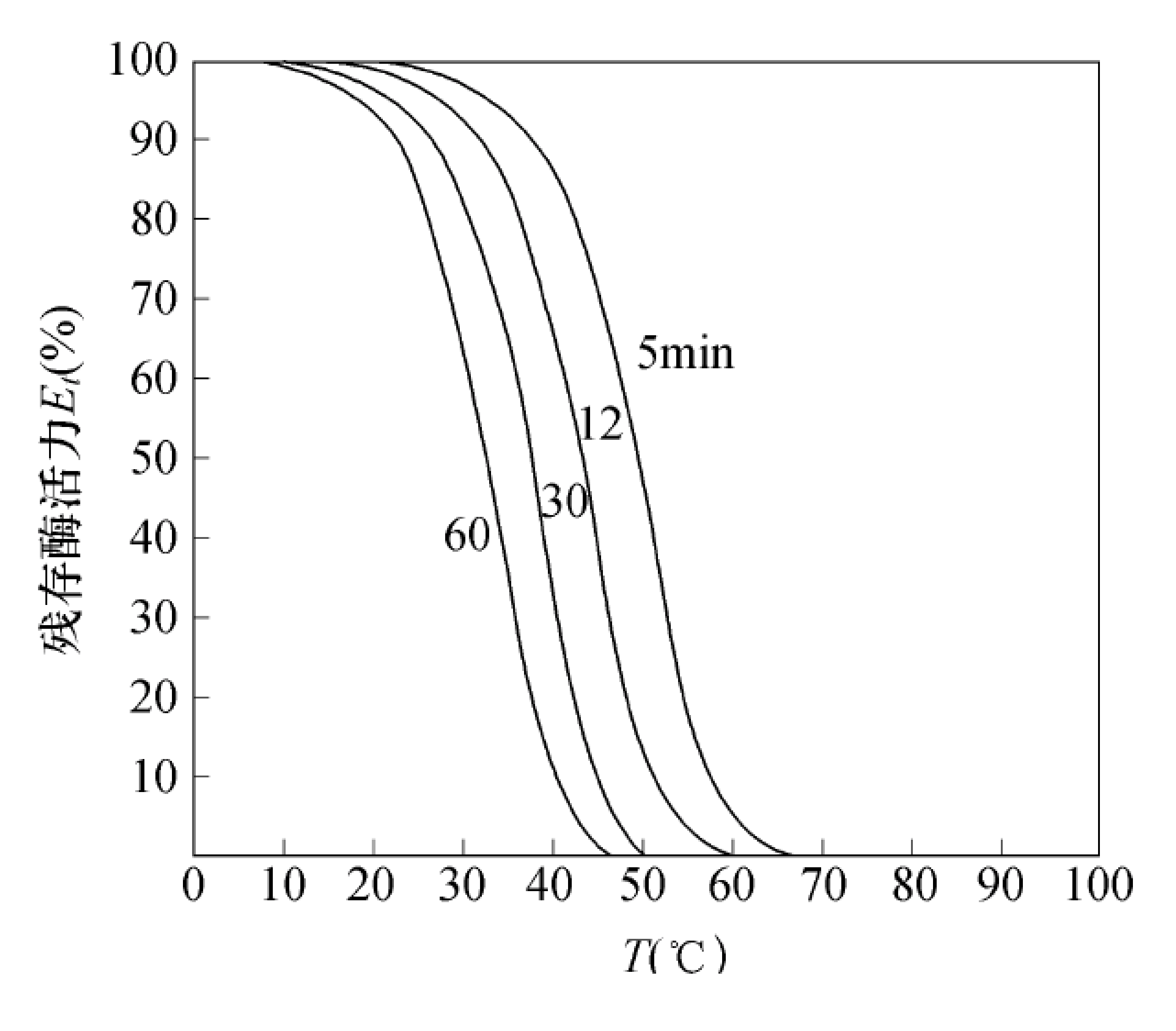



图 2-26　不同温度下的酶失活曲线

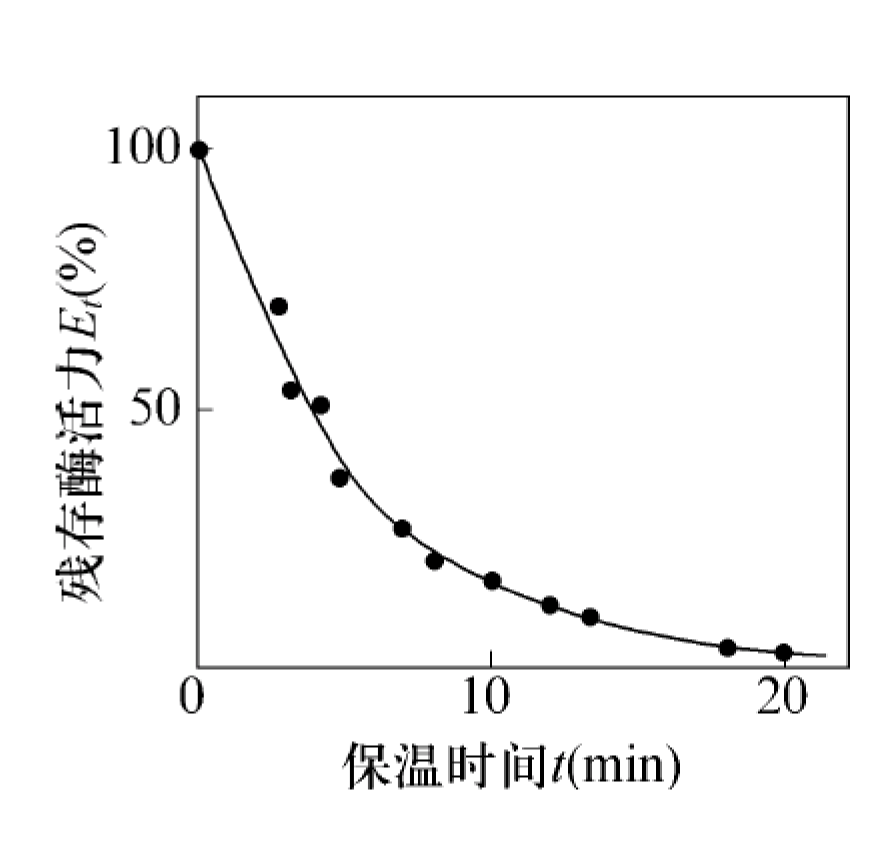


图 2-27　不同时间下的酶失活曲线

这些曲线反映了酶的失活规律。酶的热变性失活很复杂，一般将其分为可逆失活与不可逆失活两大类，并提出了多种失活动力学模型。下面主要介绍一步失活模型。

1. 一步失活模型（one step model）　多数酶的失活符合一步失活模型。其反应机制为

$$E \underset{k_r}{\overset{k_d}{\rightleftharpoons}} D \tag{2-80}$$

该模型又称为一级失活模型。k_d 和 k_r 分别表示正、逆反应的速率常数。以 E 和 D 分别表示活性酶与失活酶，时间为 t 时，活性酶 E 的浓度为 c_{E_t}，则活性酶的浓度随时间的净减少率或失活反应方程式可表示为

$$-\frac{dc_{E_t}}{dt} = k_d c_{E_t} - k_r c_D \tag{2-81}$$

系统中酶的总浓度若以 c_{E_0} 表示，则存在下述关系式。

$$c_{E_0} = c_{E_t} + c_D \tag{2-82}$$

式中，c_D为失活酶的浓度。

将式（2-82）代入式（2-81），并利用边界条件 $t=0$，$c_{E_0} = c_{E_t}$ 积分，经整理可得下式。

$$c_{E_t} = \frac{c_{E_0}}{k_d + k_r}\{k_r + k_d \exp[-(k_d + k_r)t]\} \tag{2-83}$$

对不可逆失活反应，$k_r = 0$，可得

$$c_{E_t} = c_{E_0} \exp(-k_d t) \tag{2-84}$$

多数酶的热失活服从式（2-84），k_d 可称为一步失活常数或衰变常数，单位为（时间）$^{-1}$。k_d 的倒数称为时间常数 t_d。当 c_{E_t} 为 c_{E_0} 的一半的时间称为半衰期，用 $t_{1/2}$表示。k_d、t_d 和 $t_{1/2}$之间的关系为：

$$k_d = \frac{1}{t_d} = \frac{\ln 2}{t_{\frac{1}{2}}} \tag{2-85}$$

2. 多步失活模型（multi-step model）　多步失活模型可划分为：多步串联失活模型，酶的失活经历多步，即 D→F→E；同步失活模型，全部酶分子可划分为热稳定性不同的若干个组分，每个组分均符合一步失活模型。

对同步失活模型，全部酶中残存酶活力的比率

$$\varphi(t) = \frac{c_E}{c_{E_0}} = \sum_i x_i \exp(-kt) \tag{2-86}$$

式中：c_{E_0}表示酶的初始浓度；x_i表示失活速率常数为 k_i的酶组分的分率。因此，

$$\sum_i x_i = 1$$

3. 温度对酶失活的影响 温度对酶失活的影响体现在改变酶失活速率常数上。对一级失活模型，有失活反应Arrihenius方程

$$k_d = A_d \exp\left\{-\frac{E_d}{RT}\right\} \tag{2-87}$$

式中：k_d 表示衰变常数；A_d 表示失活反应 Arrihenius 方程的前指因子；E_d 表示失活反应活化能。

一般蛋白质的变性或失活的活化能为125kJ·mol^{-1}，高于一般化学反应的活化能（20～83kJ·mol^{-1}），这意味着酶失活对温度十分敏感。同时考虑温度和时间对酶失活影响的关系式

$$A(t,T) = \frac{c_E}{c_{E_0}} = \exp\left[-Adt\exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)\right] \tag{2-88}$$

在同一温度下保温时间越长，残存酶活力越低。

2.4.2 反应时酶的热失活动力学

反应时酶的失活（或称酶的稳定性）将直接关系到酶的使用寿命，因此至关重要。酶在反应中的稳定性称为操作稳定性，可以通过分批测定、连续测定及圆二色谱分析等方法测定。作不同温度下反应转化率随时间的变化曲线，即反应过程曲线，如图 2-28 所示。时间一定时，随着温度的升高，反应速率增大，因而转化率增加；但当温度高到某一数值时，其转化率反而减少。因为当温度升高到某一值，酶的热失活速率也在加速，致使有活力酶的量在减少，因而反应速率下降，最终为零。同时从图中曲线还可看出，对某一反应时间，存在一转化率最高的温度，该温度称为最佳温度。不同的反应时间，有不同的最佳温度。最佳温度是温度对酶催化速率和酶失活速率双重作用的结果。

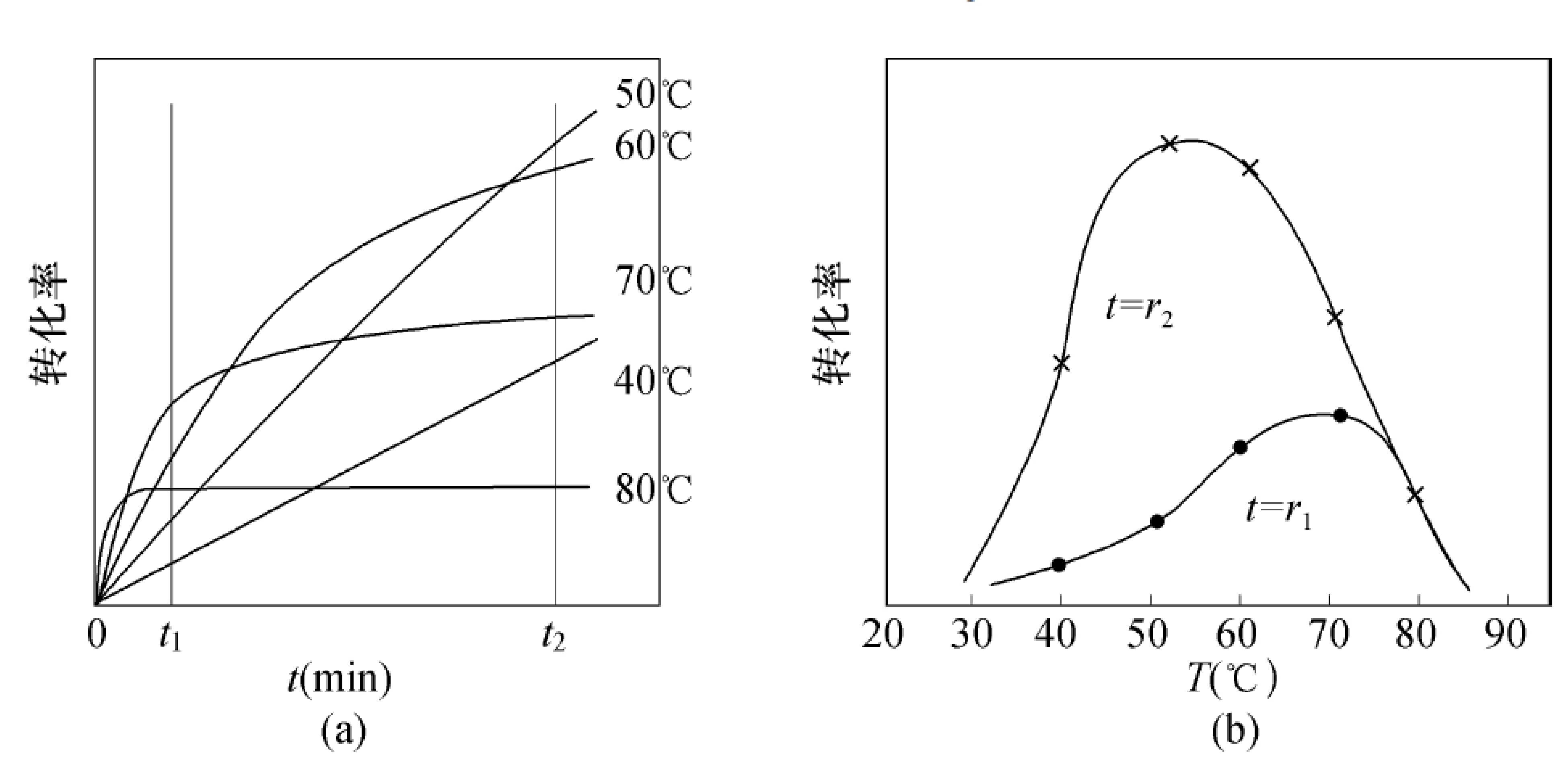


图 2-28 不同温度下酶促反应过程曲线

（a）以温度 T 为参数，转化率 X 与时间 t 的关系曲线；

（b）以时间 t 为参数，转化率 X 与温度 T 的关系曲线

就底物浓度的变化对酶失活的影响，提出了下述模型。

$$\begin{array}{ccc} E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & ES \xrightarrow{k_2} P + E \\ \downarrow k_d & \downarrow \delta k_d \\ D & D + S \end{array} \tag{2-89}$$

从上述机制可看出，无论是游离酶，还是酶的复合物，均有可能失活，其失活速率方程可表示为

$$-\frac{dc_{E_t}}{dt} = k_d \frac{K_m + \delta c_S}{K_m + c_S} \cdot c_{E_t} \tag{2-90}$$

式中

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{2-91}$$

$$c_{E_t} = c_{E_f} + c_{E_S} \tag{2-92}$$

式中：δ 表示底物对酶失活的影响系数；c_{E_f} 表示游离酶浓度。

根据上述模型可知：

（1） 当 $\delta = 0$ 时，反应时酶失活速率达到最低。从反应机制中可以看出，当 $\delta = 0$ 时，复合物 ES 完全不失活，或者说酶完全被底物所保护。底物对酶失活没有影响。

（2） 当 $\delta = 1$ 时，反应时与未反应时酶的失活速率完全相同。从反应机制中可以看出，复合物 ES 与游离酶 E 失活速率常数完全相同。

（3） $0 < \delta < 1$ 时，反应时酶失活速率低于未反应时酶失活速率。从反应机制可以看出，$0 < \delta < 1$ 时，复合物 ES 失活速率常数低于游离酶 E，或者说底物对酶失活有部分保护作用，能在一定程度上抑制酶的失活。

（4） $\delta > 1$ 时，反应时酶失活速率高于未反应时酶失活速率。从反应机制中可以看出，复合物 ES 失活速率常数大于游离酶 E 失活速率常数，或者说底物加速酶的失活。

由上述分析可见，δ 反映了底物对酶失活速率的影响，因此称 δ 为底物对酶失活影响系数（也称为稳定性影响系数）。

若只有游离酶失活时，其分批反应的动力学方程为

$$-\frac{dc_S}{dt} = \frac{k_2 c_S}{K_m + c_S}\left(c_{E_0} - \frac{k_d K_m}{k_2}\ln\frac{c_{S_0}}{c_S}\right) \tag{2-93}$$

对于零级不可逆反应，c_S 值趋于无穷大，因此有

$$-\frac{dc_S}{dt} = k_2 c_{E_t} \tag{2-94}$$

对该式积分，得到

$$c_{S_0} - c_{S_t} = k_2 \int_0^t c_{E_t} dt \tag{2-95}$$

当 c_S 值足够大时，可简化为

$$-\frac{dc_{E_t}}{dt} = k_d \delta c_{E_t} = k'_d c_{E_t} \tag{2-96}$$

进行积分得到

$$c_{E_t} = c_{E_0} \exp(-k'_d t) \tag{2-97}$$

代入式中积分得

$$c_{S_0} - c_{S_t} = \frac{k_2 c_{E_0}}{k_d'} [1 - \exp(-k_d' t)] \quad (2\text{-}98)$$

式中，k_2，k_d' 均为温度的函数。

2.4.3　失活动力学研究实例

以青蟹 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶在甲醛溶液中的失活动力学的研究为例，通过在酶活力测定体系中加入不同浓度的甲醛，检测酶的剩余活力（图 2-29）。研究显示酶在甲醛溶液中的失活作用是一种可逆过程。建立失活动力学模型，可以测定游离酶（E）和结合酶（ES）的微观失活速度常数（表 2-6）。

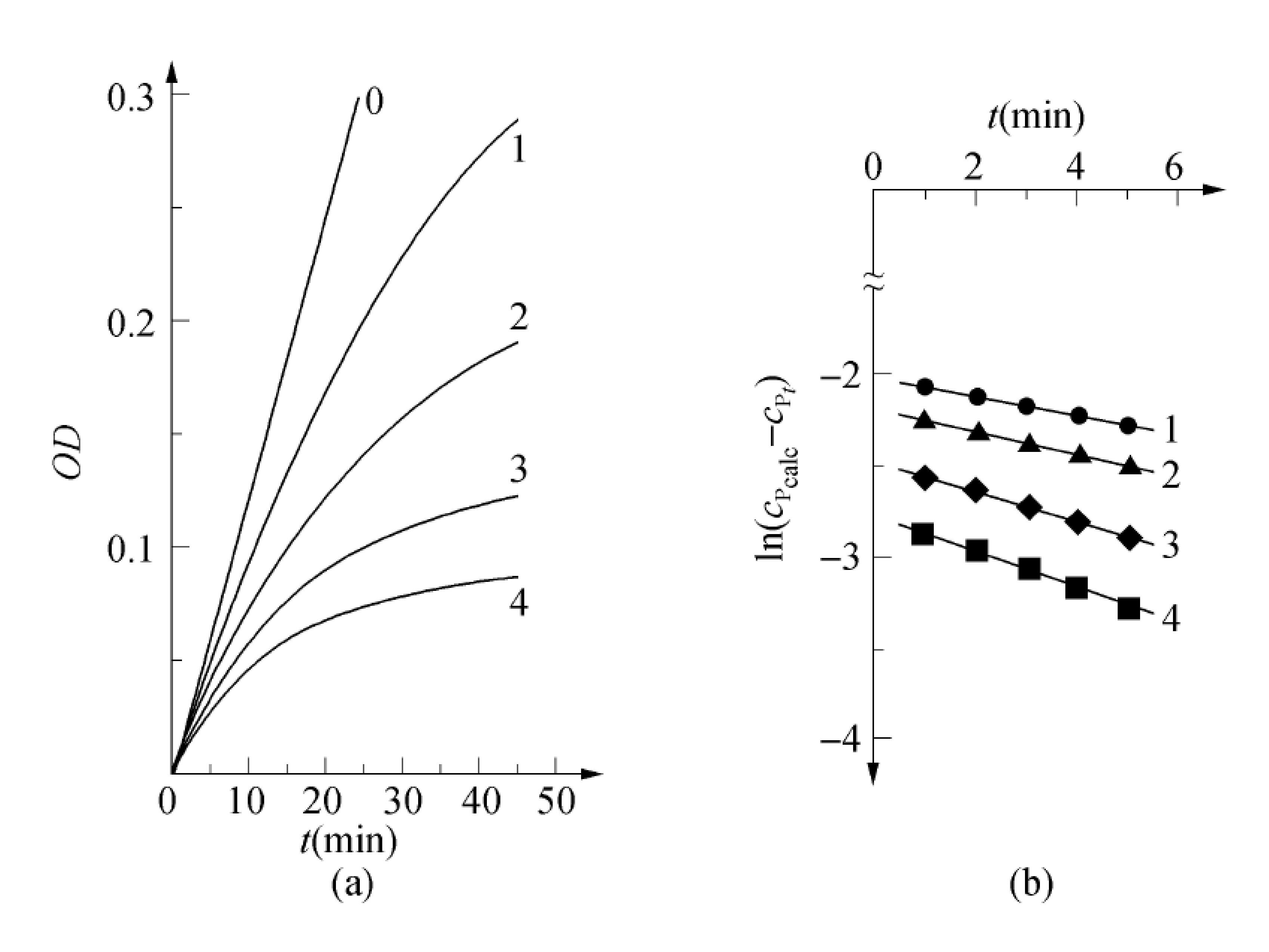


图 2-29　酶在不同浓度甲醛中的失活作用动力学

（a）动力学过程；（b）半对数作图。0～4 代表不同浓度的甲醛

表 2-6　青蟹 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶在甲醛溶液中的失活速度常数

甲醛浓度（mol·L⁻¹）	失活速度常数（$10^3 \cdot s^{-1}$）			相对活力（%）
	k_{+0}	k_{-0}	k'_{+0}	
0				100.0
0.2	1.086 ±0.020	0.229 ±0.010	0.209 ±0.015	81.5 ±1.5
0.4	1.535 ±0.025	0.136 ±0.015	0.349 ±0.010	60.8 ±1.0
0.6	1.613 ±0.022	0.078 ±0.005	0.633 ±0.010	49.5 ±0.9
0.8	2.249 ±0.025	0.054 ±0.008	0.901 ±0.013	38.5 ±0.6

从表 2-6 中可以看出，在相同浓度的甲醛溶液中，游离酶的正向微观失活速度常数（k_{+0}）是酶底物络合物的失活速度常数（k'_{+0}）的 3～5 倍，表明游离酶比结合酶更容易失活；此外，正向反应的微观失活速度常数 k_{+0}随着甲醛浓度的增加而增加，说明其变性越来越快，逆向反应的微观速度常数 k_{-0}相反地随着甲醛浓度的增大而下降，表明酶复活的过程越来越慢。

2.5　非水相酶催化反应

2.5.1　非水相酶的特点

传统观点认为，酶是水溶性生物大分子，只能在水溶液中进行催化反应，水溶液是酶存在及起催化作用的天然介质，而且由于水的存在，往往有利于如水解、消旋化、聚合和分解等副反应的发生。通常有机介质会使酶变性失活，但许多有机化合物在水介质中难溶或不溶，水并不是一种适宜的溶剂。那么，是否存在非水介质也能保证酶催化的顺利进行？

其实在细胞中，许多生物膜上的酶就是在低极性的微环境中发挥催化功能的。近年来，酶在有机介质中催化反应的相关研究取得很大进展，并已在实际工作中得到广泛应用。1984 年，Klibanov 等在 *Science* 上发表题为 “Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100℃” 的论文，使原来认为生物催化必须在水溶液中进行的酶学概念发生了革命性的变化。他们成功地利用脂肪酶在有机介质中进行催化反应，获得酯类、肽类、手性醇等多种有机化合物，明确指出酶可以在水与有机溶剂的互溶体系中进行催化反应。脂肪酶在有机溶剂中具有很高的热稳定性和较高的催化活性，并阐明水对维持酶的活性结构是必不可少的，但只要保证酶分子表面的一小部分必需水，其他大部分水完全可以被有机溶剂取代而不影响酶的活力。除此之外，酶在非水相催化中还有很多成功的应用实例，因此酶在非水相催化中也具有广阔的发展前景。

2.5.2　酶非水相催化的几种类型

1. 有机介质中的酶催化　指酶在含有一定量水的有机溶剂中进行的催化反应，适用于底物、产物两者或其中之一为疏水性物质的酶催化作用。由于在有机介质中能够基本保持其完整的结构和活性中心的空间构象，所以酶能够发挥其催化功能。

有机介质反应体系又包括几种不同的情况：①单相共溶体系（水/水溶性有机溶剂）：水与水互溶的有机溶剂构成单相体系，有机溶剂与水形成均匀的单相溶液体系，酶、底物和产物都能溶解在这种体系中；②两相体系（水/水不溶性有机溶剂）：水与非极性有机溶剂构成两相或多相体系，由含有溶解酶的水相和一个非极性的有机溶剂（高脂溶性）相所组成；③低水有机溶剂体系（微水介质体系）：非极性有机溶剂 – 酶悬浮体系用非极性有机溶剂取代大量水，使固体酶悬浮在有机相中。但仍然含有必需的结合水以保持酶的催化活力（含水量一般小于 2%，酶的状态可以是结晶态、冻干态、沉淀态，或者吸附在固体载体表面上）；④反向微团体系（reversed mielle）由水 – 表面活性剂 – 有机溶剂组成的三成分微团，疏水尾部朝外，极性头部转内，把酶包裹在其中。

不管采用何种有机介质反应体系，酶催化反应的介质中都含有机溶剂和一定量的水。它们都对催化反应有显著的影响。

2. 气相介质中的酶催化　酶在气相介质中进行的催化反应，适用于底物是气体或者能够转化为气体的物质的酶催化反应。由于气体介质的密度低，扩散容易，因此酶在气相中的催化作用与在水溶液中的催化作用有明显的不同特点。

3. 超临界介质中的酶催化　酶在超临界流体中进行的催化反应。超临界流体是指温度

和压力超过某物质超临界点的流体。

4. 离子液介质中的酶催化 酶在离子液（ionic liquid）中进行的催化作用。离子液是由有机阳离子与有机（无机）阴离子构成的在室温条件下呈液态的低熔点盐类，挥发性低，稳定性好。酶在离子液中的催化作用具有良好的稳定性和区域选择性、立体选择性、键选择性等显著特点。

2.5.3 有机介质对酶性质的影响

有机介质可对酶的多方面性质产生影响，下面对其中几个主要方面进行简介。

1. 稳定性 过去认为酶在有机介质中不稳定，但研究发现大多数酶在低水有机介质中比在水介质中更稳定。表现为：①热稳定性提高。例如，猪胰脂肪酶在醇和酯中进行催化反应，在100℃高温下，其半衰期长达26h，其活性比在20℃时还高几倍。胰凝乳蛋白酶在60℃水中，几分钟就产生不可逆失活，而在100℃辛烷中，其半衰期长达几小时。②储存稳定性提高。例如胰凝乳蛋白酶在20℃时，在水中半衰期只有几天，在辛烷中，可放6个月，仍保持全部活力。在有机介质中，不同温度下保温的酶，热处理还导致酶活力增加，而且酶在温度远超过其在水溶液中最适温度的情况下也不失活。在低水有机溶剂体系中，酶的稳定性与含水量密切相关，一般在低于临界含水量范围内，酶很稳定；含水量超出临界含水量后，酶稳定性随含水量的增加而急剧降低。表2-7列举了不同酶在水溶液和有机溶剂中的热稳定性差异。

表2-7 某些酶在有机介质与水溶液中的热稳定性

酶	介质条件	热稳定性
猪胰脂肪酶	三丁酸甘油酯 水，pH 7.0	$t_{1/2} < 26h$； $t_{1/2} < 2min$
酵母脂肪酶	三丁酸甘油酯/庚醇 水，pH 7.0	$t_{1/2} = 1.5h$； $t_{1/2} < 2min$
脂蛋白脂肪酶	甲苯，90℃，400h	活力剩余40%
胰凝乳蛋白酶	正辛烷，100℃ 水，pH 8.0，55℃	$t_{1/2} = 80min$； $t_{1/2} = 15min$
枯草杆菌蛋白酶	正辛烷，110℃	$t_{1/2} = 80min$
核糖核酸酶	壬烷，110℃，6h 水，pH 8.0，90℃	活力剩余95%； $t_{1/2} < 10min$
酸性磷酸酶	正十六烷，80℃ 水，70℃	$t_{1/2} = 8min$； $t_{1/2} = 1min$
腺苷三磷酸酶 （F1-ATPase）	甲苯，70℃ 水，60℃	$t_{1/2} > 24h$； $t_{1/2} < 10min$
限制性核酸内切酶（*Hind* Ⅲ）	正庚烷，55℃，30d	活力不降低
β-葡萄糖苷酶	2-丙醇，50℃，30h	活力剩余80%
溶菌酶	环己烷 110℃ 水	$t_{1/2} = 140min$； $t_{1/2} = 10min$

2. 酶活力　在单相共溶体系，有机溶剂对酶活力影响分为两个方面：一方面有机溶剂直接作用于酶，破坏维持酶活力构象的氢键和疏水作用力，或破坏酶周围水化层，使酶变性或失活。如不少酶活力随有机溶剂浓度升高而降低。另一方面有些酶活力会随有机溶剂浓度升高而增大，在某一浓度（最适浓度）达最大值；若浓度再升高，则活力下降。如胰蛋白酶在 1，4-丁二醇中最适浓度为 80%，猪心线粒体 ATP 酶在乙醇中最适浓度为 10%，限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ在甘油中最适浓度为 20%。

在低水有机溶剂体系，酶活力也发生变化。如沉积在玻璃球上的胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶在有机溶剂中催化胆固醇的氧化速度，是酶在水中催化速度的 10%～25%。又如用酵母醇脱氢酶在含 1% 水的醋酸丁酯中催化肉桂醇氧化，酶活力是水中的 1%～64%。对各种水活度下吸附在不同载体上胰凝乳蛋白酶或乙醇脱氢酶的酶活力研究表明，酶活力随水活度大小而变化，而在一定水活度下，酶活力随载体不同而变化。

在反向微团体系中，微团效应使某些酶活力增加，比较反向微团漆酶和水中漆酶催化邻苯二酚氧化最大速率，微团中酶活力至少增大了 100 倍。反向微团酶催化的一个重要特点是酶活力依赖微团的含水量，更确切地说，是取决于水与表面活性剂的摩尔比（*R*）。

3. 专一性　某些有机溶剂会使某些酶的专一性发生变化，如脂肪酶在有机介质中有合成肽键的功能、限制性核酸内切酶（简称限制酶）的星号活力（非标准反应条件下，内切酶识别切割能力下降，识别特异性下降的现象）。对限制酶的研究表明：①某些有机介质（如二甲基亚砜、甘油、乙二醇）可使部分限制酶的专一性发生改变，使其专一性降低，且发现其星号活力比原专一性活力弱。②不同的有机介质对同一种限制酶专一性影响不同。③同一种有机介质对不同的限制酶（即使是异源同功酶）的专一性影响也不同。如胰凝乳蛋白酶在水中催化 *N*-乙酰-*L*-苯丙氨酸乙酯水解比催化 *N*-乙酰-*L*-组氨酸乙酯水解快 100 倍，而在辛烷中情况恰恰相反，这是疏水驱动力作用的结果；猪胰脂肪酶在水中可以各种大小的醇分子作为亲核试剂进行转酯反应；在有机介质中只催化小分子醇反应，而叔醇等大分子醇则难反应，这是酶活力中心构象刚性增强的结果；醇脱氢酶催化烷醇氧化为醛，在水溶液中辛醇是最佳底物，被反应微团包裹后，则丁醇更快被氧化。此外，有些在水中不能实现的反应途径，在有机介质中却成为主导反应。如脂肪酶没有酰胺酶活力，但在有机介质中脂肪酶却可以催化肽键合成，这为寡肽的合成又提供了新的合成途径。

4. 反应平衡　有机介质能改变某些酶催化的反应平衡。酶既可催化一个化学反应的正向反应，也可催化其逆向反应，反应平衡点的移动取决于反应条件。如蛋白水解酶在水介质中一般是催化蛋白质或肽水解，而在有机介质中却能催化其逆反应——合成肽键。例如，水解酶类（蛋白水解酶）在水介质中，水的浓度为 $55.5 mol \cdot L^{-1}$，平衡趋向水解方向，如在含水量极低的有机介质中，平衡向合成方向偏移。1937 年，贝尔格曼等首次用酶催化合成肽。近年来，利用蛋白酶逆反应的研究取得较大进展，在单相共溶体系或两相体系中都合成了肽，有的达到工业化程度，如甜味二肽及脑啡肽的合成。有机介质不仅可改变酶催化的平衡点，且不要通常多肽合成时必需的基团保护。目前特异性酶筛选和反应条件优化是酶法合成多肽的研究重点。又如脂肪酶在水介质中一般是催化酯水解，但将 1, 2-丁二醇溶于乙酸乙酯（它既是溶剂，又是酰化剂），利用脂肪酶催化，只需几个小时，97% 的丁二醇都在 1 位羟基上酰基化形成甲酯。多肽合成反应实例见表 2-8。

表 2-8　不同酶合成产物及合成产率比较

酶	合成产物	溶剂（%）	合成产率（%）
枯草杆菌蛋白酶	核糖核酸酶	甘油 90	50
无色杆菌蛋白酶	胰岛素	乙醇 30	80
凝血酶	人生长素	甘油 80	20

5. 分子印迹和 pH 记忆　酶在有机介质中能“记住”它在冻干前的结构特征，因此酶在冻干前可用配体作印迹。例如在枯草芽孢杆菌蛋白酶水溶液中加入竞争性抑制剂，其活力与未处理的酶相同，但从含有竞争性抑制剂的水溶液中冻干出来后，再将抑制剂除去，该酶在辛烷中催化酯化反应的速度比不含抑制剂的水溶液中冻干出来的高 100 倍。这可能是竞争性抑制剂诱导酶活力中心构象发生变化，形成一种高活性构象形式，而此种构象形式在去除抑制剂后，因酶在有机介质中的高度刚性而得到保持。赋形剂诱导酶活力增强机制与配体诱导相同。

酶在有机介质中还能“记住”它最后存在过的水溶液的 pH。因为该 pH 决定了酶分子上有关基团的电离状态，这种状态在冻干过程和分散到有机介质中后仍得到保持。

2.5.4　有机介质酶催化反应的优点

目前有机介质中的酶催化反应已成为非常热门的一个研究领域。现已确认，与水溶液中的反应相比，酶在有机介质中不但能保持其活力，还表现出一些特殊性质，并具有如下优越性：

（1）有利于疏水性底物的反应。在有机介质中，由于水分子的减少，相对来说，酶分子的构象表现出比水溶液中更具有“刚性”特点。因而使通过选择不同性质的溶剂来调控酶的某些特性成为可能。可以催化疏水性底物的合成反应或一些在水相中很难进行的反应。例如在有机溶剂中，可以利用酶与配体的相互作用性质，诱导改变酶分子的构象，调控酶的底物专一性、立体选择性和手性选择性等（如由于水解作用，羧酸酯在水溶液中的酯交换反应很难进行，但在有机溶剂中，水解酶可以很容易地催化酯交换反应）。

（2）有利于产物的分离和酶的回收与再利用。因为在水溶液中产物的回收通常是比较困难的或是价格昂贵的。

（3）可改变反应平衡移动方向。

（4）可控制底物专一性。可以控制或改变底物专一性或区域选择性。由于许多反应的动力学平衡很大程度上依赖于溶剂，这样就可以选择有利于产物形成的反应介质。

（5）可防止由水引起的副反应。

（6）可扩大反应 pH 的适应性。

（7）可提高酶的热稳定性，提高催化温度，酶在有机溶剂中的构型比在水中更加紧凑，酶的热稳定性显著提高。

（8）用非水溶液的生物催化反应器可避免微生物污染。

（9）能催化在水中不能进行的反应。

有机溶剂中的酶活力部位的结构与在水溶液中是一致的，但在有机溶剂中酶分子间的氢键极少，而分子内部基团间的氢键占有主导地位，所以，蛋白质结构变得更“刚性”，提高

了酶的热稳定性。若保证必需水含量、选择合适的酶及酶形式、合适的溶剂及反应体系、最佳 pH，则酶可在有机介质中显示很高的催化活性。目前在有机介质中已成功用酶进行了氧化、脱氢、脱氨、还原、羟基化、甲基化、环氧化、酯化、酰胺化、磷酸化、开环反应、异构化、侧链切除、缩合及卤代等反应。

2.5.5　有机介质中酶催化反应的条件及其控制

1. 反应体系中必需水（结合水）对酶催化反应的影响　酶都溶于水，只有在一定量的水存在的条件下，酶分子才能进行催化反应。所以，酶在有机介质中进行催化反应时，水是不可缺少的成分之一。有机介质中的水含量多少与酶的空间构象、酶的催化活力、酶的稳定性、酶的催化反应速度等都有密切关系，水还与酶催化作用的底物和反应产物的溶解度有关。酶分子只有在空间构象完整的状态下，才具有催化功能。在无水的条件下，酶的空间构象被破坏，酶将变性失活。所以，酶分子需要一层水化层，以维持其完整的空间构象。这紧紧吸附在酶分子表面，维持酶分子完整的空间构象所必需的最低水量称为必需水（或结合水、束缚水）。酶的活力由必需水决定，而与溶剂里的水含量无关。因此，可把有机介质中酶促反应理解为宏观上是在有机介质中，而在微观上仍是水中的酶促反应。正因如此，才能使用有机介质代替水溶液，进行酶促反应。只要必需水不丢失，其他大部分水即使都被有机溶剂取代，酶仍然保持其催化活性。

酶催化活力所必需的构象，是由水分子直接或间接地通过氢键等非共价相互作用来维持的，因此，只有与酶分子紧密结合的单层水分子，对酶的催化活力才是至关重要的。有机介质中水的含量对酶催化反应速度有显著影响，存在最适水含量。酶的必需水含量因酶和溶剂而异。不同的酶需水量不同。脂肪酶只需几个水分子，胰凝乳蛋白酶在辛烷中需 50 个水分子，在其他溶剂中需水更少；而乙醇脱氢酶、酪氨酸酶、醇氧化酶、多酚氧化酶等则需要几百个水分子。可能真正的酶催化反应发生在酶表面的必需水层中，底物分子必须先从有机相进入水相，才能与酶分子发生作用。同一种酶在不同溶剂中需水量也不同。溶剂疏水性越强，需水量越少。如胰凝乳蛋白酶，在二异丙醚、二氯乙烷或氯仿中，1% 含水量活力最高；在更疏水的甲苯中，只要 0.5% 的水量就可达到最大活力；在较亲水的乙酸乙酯中，则要求更高的含水量。一般认为，酶要与有机溶剂互相争夺水分以维持必要的水合状态。反映必需水作用的合适参数是热力学水活度，即在一定的温度压力下，反应体系中的水蒸气压与纯水的蒸气压之比。水活度参数易测且可直接反映酶分子上水分的多少，与体系中水含量及所用溶剂无关。

有两种方法可获得恒定的水活度：一是底物溶液和酶制剂分别与一种无机盐的饱和溶液预平衡获得一定的水活度，然后两者混合起来反应；二是向干燥的反应混合物中加入一种盐的高水合物，后者释放部分水到体系中并部分转化成其低水合物。后一种方法更优越。

一个干燥的酶水合吸附水量具体如下所述：酶分子表面电荷基团 0 ~ 0.07 $g \cdot g^{-1}$（水/酶）；酶分子表面极性基团 0.07 ~ 0.25 $g \cdot g^{-1}$；弱极性、非极性基团 0.25 ~ 0.28 $g \cdot g^{-1}$。表面完全水化，被一层水分子包围。

2. 对酶的要求　酶种类选择适于有机介质的酶，应具对抗有机介质变性的潜在能力，在有机介质中能保持催化活力构象。由于酶组成及构象的多样性，除少数酶外，大多数酶均能在有机介质中进行催化反应。已报道的酶类有脂肪酶、蛋白酶、次黄嘌呤氧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、醛缩酶、多酚氧化酶、醇脱氢酶、细胞色素氧化酶、ATP 酶、胆固醇氧

化酶等。酶是否适于有机介质中工作，主要取决于酶－底物、产物－溶剂间的关系。

（1）酶形式选择：为提高酶在有机介质中的溶解度、稳定性和活力，酶形式选择很重要。处于分散状态的一般酶在有机介质中几乎不溶，呈聚集状态。为使酶与底物充分接触，可将酶制成冰冻干粉，并在有机介质中剧烈搅拌或用超声波处理，使酶颗粒变小。控制好酶量也很重要。有人研究 α-胰凝乳蛋白酶在乙醇中转酯反应，发现催化活力随反应体系中酶量的减少而显著增加。很可能酶活力决定于酶聚体表面那部分酶分子。水含量不变，减少体系中酶量到最佳，使酶聚体变小，增大了酶与底物的接触面，消除底物扩散的局限，酶活力反而增强。

（2）化学修饰：有些酶尽管在有机介质中有活力，但操作稳定性差，通过化学修饰可改变酶的理化性质，使其溶解于有机介质，且稳定性和活力提高。化学修饰方法很多，其中聚乙二醇（PEG）修饰较常见。例如，用 PEG 修饰过氧化氢酶，使其在有机介质中活力显著提高。磁性脂肪酶（磁性颗粒外包 PEG 修饰的脂肪酶）在有机介质中较稳定，活力也较高，且可在磁场中回收。用谷氨酸、十二醇、葡萄糖酸内酯合成糖类脂，用此糖类脂修饰超氧化物歧化酶（SOD），所得的修饰 SOD 变成了脂溶性而水不溶性的酶。该酶在有机介质中活力高于在水中的活力。该酶对温度、pH、蛋白酶水解的稳定性均高于天然 SOD。研究不同修饰酶在有机介质中的表现，发现化学修饰（如脱糖基化、苯甲基、PEG 修饰）能够增加酶的表面疏水性，而疏水性增加提高了酶在有机介质中的活力。PEG 修饰酶在甲苯中活力比未修饰酶高 16 倍。通过蛋白质甲基化作用，疏水分子对酶蛋白的修饰均可提高酶在有机介质中的溶解性、稳定性和活力。

（3）载体：把酶固定在载体上制成固定化酶，其对抗有机介质变性的能力、反应速度、热稳定性都可提高。载体对酶的影响有下述几个方面：首先，载体能通过分配效应剧烈地改变酶微环境中底物和产物的局部浓度。例如，对几种不同载体的固定化脂肪酶研究表明，疏水性琼脂珠载体效果最好，其固定化脂肪酶在有机介质中的活力比对应酶粉高 46.5%。由于载体上疏水基团的存在，使疏水性底物在疏水作用下分配到载体周围的浓度高于反应介质中的浓度，使酶反应速度提高。其次，载体影响酶分子上的结合水。亲水性高的载体会从溶剂和酶中夺取大量的水，降低酶的活力；亲水性低的载体不夺取酶的必需水，酶活力较高。再者，通过载体与酶之间形成的多点结合作用，可稳定酶的催化活力构象。此外载体影响酶的动力学，影响一个酶同时催化的两个反应的相对速度。如在低水活度下把胰凝乳蛋白酶固定在聚酰胺载体上，水解反应被抑制但有利于醇解反应。因此，载体要选择疏水性基质，具有高氧渗透性的硅聚合物比较好。另外，还应考虑酶的负载量、载体的表面积、颗粒大小、内部孔径大小、酶与载体间的相互作用等。

3. 反应体系中有机溶剂对酶催化反应的影响 在水溶液中，酶分子均一地溶解在水溶液中，可以较好地保持其完整的空间结构。在有机溶剂中，酶分子不能直接溶解，而是悬浮在溶剂中进行催化反应。根据酶分子的特性和有机溶剂的特性的不同，保持其空间结构完整性的情况也有差别。

有机溶剂通过 3 种方式影响酶催化。

（1）通过影响底物、产物在水相和有机相中的分配，从而影响底物在酶必需水层中的浓度来改变酶催化反应速度：有机溶剂与水之间的极性不同，在反应过程中会影响底物和产物的分配，从而影响酶的催化反应。强极性有机溶剂可溶解大量水，有夺走必需水的趋势，导致酶失活。

（2）直接与酶必需水作用：疏水性溶剂不与酶必需水作用，对酶活力影响小。如胰凝乳蛋白酶在辛烷中反应速度比在吡啶中快 10 倍，其活力随溶剂的疏水性增强而增大。

（3）直接和酶发生作用：有机溶剂使底物基态能级下降或使酶 – 底物复合物能级升高，从而增大酶反应的活化能来降低酶反应速度；其次，有机溶剂分子进入酶活力中心，降低中心内部极性并加强底物与酶之间形成的氢键，使酶活力下降；有机溶剂侵入还会造成酶三级结构化，间接改变酶活力中心结构来影响酶活力。极性较强的有机溶剂，如甲醇、乙醇等，会夺取酶分子的结合水，影响酶分子微环境的水化层，从而降低酶的催化活力，甚至引起酶的变性失活。因此，应选择好所使用的溶剂，控制好介质中的含水量，或者经过酶分子修饰提高酶分子的亲水性，避免酶在有机介质中因脱水作用而影响其催化活力。

选择有机溶剂还必须考虑以下几种因素：①溶剂与反应的相容性；②溶剂对反应应该是惰性的；③溶剂的密度、黏表面张力、毒性、废物的处理和成本等。普遍公认的溶剂参数是 lgP，即一种溶剂辛醇/水两相间分配系数的常用对数值。它能直接反映溶剂的疏水性。在加入等量水的情况下，溶剂的 lgP 值越高，酶活力越高。要得到酶最佳活力表达，不同的溶剂需水量不同。溶剂的 lgP 值越高，所需最佳水量越少。另外还要控制酶的水合程度，即在恒定的水活度下比较酶活力，以避免水的干扰。常用的有机溶剂有辛烷、正己烷、苯、吡啶、季丁醇、丙醇、乙腈、已酯、二氯甲烷等。

4. 合适反应体系　酶催化反应的有机介质有下述几种体系：①单相共溶体系（水/水溶性有机溶剂）；②两相体系（水/水不溶性有机溶剂）；③低水有机溶剂体系；④反向微团体系。前 3 种体系都较易构建，以低水有机溶剂体系对有机合成最有利，适于疏水有机介质和高温反应，但缺点是：扩散限制严重，反应速度慢，不能用分光光度技术跟踪反应进程。而反向微团体系可克服这些缺点。由水 – 表面活性剂 – 有机溶剂组成的 3 成分微团，疏水尾部朝外，极性头部转内，把酶包裹在其中，借此模拟酶在活细胞的功能反应，发现酶具超活力（super-activity）（高于水溶液中酶活力值的活力）。酶性质也发生改变，不论亲水酶类、疏水酶类，还是两亲酶都能制成反向微团，这种通用性表明酶已克服有机介质的障碍，具更高活力，但微团结构易破坏，容纳酶量有限，产物和酶不易回收。

5. 合适的 pH　保证有机介质中酶的微环境具有最适 pH。在有机介质中，酶反应的 pH 靠酶分子周围的必需水维持，而必需水的最适 pH 与水溶液中反应时的最适 pH 一致。所以，酶应从具最适 pH 的缓冲液中冻干或沉淀出来，以保证有机介质中酶的微环境具有最适 pH。

2.5.6　非水介质中酶催化反应在有机合成中的应用

近十几年来，酶在有机介质中的催化作用研究取得了突破性进展，使得传统酶学领域迅速生长出一个新的分支——非水酶学。研究在非水介质酶的催化行为，使人们可以充分利用生物催化剂（所独有的选择性好、反应条件温和以及催化效率高等优点）来取代常规催化剂，完成许多有价值的有机合成反应，或者催化许多动力学上很难进行的反应。目前，许多非水介质中的酶催化反应已经成功地用于天然产物、药物等有机化合物的合成。例如，蛋白水解酶或脂肪水解酶催化的逆反应可用于肽或酯的合成。另外，蛋白水解酶还可以催化非蛋白氨基酸底物参与的合成反应。表 2-9 列举了酶非水相催化的应用。

表 2-9　酶非水相催化的应用

酶	催化反应	应　　用
脂肪酶	肽合成 酯合成 转酯 聚合 酰基化	青霉素 G 前体肽合成 醇与有机酸合成酯类 各种酯类生产 二酯的选择性聚合 甘醇的酰基化
蛋白酶	肽合成 酰基化	合成多肽 糖类酰基化
羟基化酶	氧化	甾体转化
过氧化物酶	聚合	酚类、胺类化合物的聚合
多酚氧化酶	氧化	芳香化合物的羟基化
胆固醇氧化酶	氧化	胆固醇测定
醇脱氢酶	酯化	有机硅醇的酯化

1. 蛋白水解酶催化的多肽合成反应　生物活性肽，特别是寡肽，在免疫调节、激素调节、酶抑制、抗菌、抗病毒等方面有很大的应用潜力。但肽合成反应不适合在水相中进行，因为在水相中键容易水解，导致副反应的产生，特别在相对较短的寡肽合成过程中会因此产生大量副产品；其次，作为底物的氨基酸衍生物在水相中的溶解度很低，直接导致产量下降。目前在低水的有机溶剂中，利用悬浮、固定化和经过化学修饰的酶，成功地进行了大量二肽和三肽的合成，以及部分寡肽（阿斯巴甜、赖氨酸甜肽、血管紧张肽、脑啡肽等）的合成。还实现了某些二肽和三肽的连续合成，如 N-CBZ-Asp-Phe-OMe（阿斯巴甜前体）、Mal-Tyr 两种二肽的合成已实现商业生产，并分别达到了数吨和数千克规模。

2. 脂肪水解酶催化的酯合成反应　在异丙醚中，用固定化脂肪酶在 35℃ 催化反应时，催化反应的产率提高至 73.8%，而传统方法只能得到 7% 的产率。维生素 A 的重要药理活性受到药物化学家的关注；但是，维生素 A 不稳定，在空气中易氧化，在紫外照射下易失活。解决问题的方法之一是将维生素 A 酯化，从而提高它的稳定性。用不同的化学方法合成维生素 A 酯时，均发现维生素 A 的降解严重，产生的副产物较多，降低了酯化产率。而用 5 种脂肪酶在不同的有机溶剂中催化合成几种维生素 A 酯，其中，在已烷中用脂肪酶催化合成油酸维生素 A 酯时，产率达到 90%，可以有效地避免化学法引起的副反应。

2.6　辅助因子工程

根据酶的化学组成可将酶分为两大类：一类酶只含有蛋白质成分，称为单纯酶，如脲酶、溶菌酶、淀粉酶、脂肪酶、核糖核酸酶等；另一类酶除蛋白质部分外，还含有非蛋白成分（辅助因子），被称为结合酶或全酶。辅助因子能促进酶及反应物进入活化状态从而加速酶催化反应，它包括种类很广的物质，可以是一种金属离子、激活剂或一种有机分子。

结合酶中辅助因子或松或紧地与酶相结合，参与的酶促反应主要为氧化－还原反应或基团转移反应，酶蛋白和辅助因子单独存在均无催化活性，只有二者结合为全酶才有催化活性。辅助因子根据其特点又分为 3 类：金属离子，直接作为辅助因子；辅基，指与酶蛋白结

合紧密的小分子有机物；辅酶，指与酶蛋白结合比较疏松的小分子有机物。

作为一种重要的辅助因子，辅酶在酶促反应中有重要作用。辅酶可直接参与反应，每一种辅酶都具有特殊的功能，可以特定地参与某一类型的反应；同一种辅酶可以和多种不同的酶蛋白结合。通常情况下，结合酶中的辅酶决定了酶所催化的类型（反应专一性），而酶蛋白则决定了所催化的底物类型（底物专一性）。大多数辅酶的前体主要是水溶性 B 族维生素，许多维生素的生理功能与辅酶的作用密切相关。例如，氧化还原酶中大约 80% 需要尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+、NADH）作为辅酶，10% 的酶以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$、NADPH）为辅酶，很少一部分以黄素（FMN、FAD）和辅酶 Q 为辅酶。在酶促反应中辅助因子与酶结合，并作为氧化剂或还原剂直接参与反应。

2.6.1　酶的辅助因子及其作用

随着生物催化技术的不断成熟和广泛应用，酶已经进入大规模工业应用阶段。以氧化还原酶为例，由于其在催化制备手性醇、羟基酸、氨基酸方面显示出极大的优势，如甾体化合物、生物碱、胆红素等药物和手性化合物的专一性合成，酶法分析等，它的应用也越来越受到人们的重视。然而，氧化还原酶催化过程必须有辅酶的参与，而辅酶价格通常比酶促反应所得产物要贵得多，即使相对廉价的 NAD^+，其价格至少每克 100 元，使用氧化还原酶进行生物催化时，合成产物的同时会消耗一定量的辅酶，如何保证辅酶的高效供应是开发氧化还原酶催化反应的关键技术之一。

辅助因子工程是采用分子生物学的手段，改造细胞内辅助因子的再生途径，通过调控微生物细胞内辅助因子的形式和浓度，定向改变和优化微生物细胞代谢功能，实现代谢流最大化、快速化地导向目的代谢产物。辅助因子工程所涉及的辅助因子主要有 ATP/ADP/AMP、$NADH/NAD^+$、$NADPH/NADP^+$、乙酰辅酶 A 及其衍生物、维生素和微量元素。其中 $NADH/NAD^+$ 作为重要的辅助因子全程参与了微生物细胞内 300 多个氧化还原反应，也是研究最为深入的辅酶。

2.6.2　辅助因子的再生策略

根据生物催化反应过程的经济性和工业可行性，氧化还原酶在应用中除了必须有合适的酶和反应工程技术以外，还必须提供高效、低成本的辅酶再生系统，对辅酶进行再生并循环使用，使辅酶保持在一定的催化剂量水平。近年来，为了解决辅酶再生这一问题，已经提出了一系列的方法，如化学法、酶法、电化学法、光化学法和基因工程法等。化学法利用一些化学试剂（如吩嗪甲基硫酸盐、黄素衍生物）与辅助因子的氧化还原反应来实现辅助因子再生；电化学法是通过电极的电子传递直接实现辅助因子再生，不需要引入其他酶和底物，避免了副产物；光化学法是含有光敏剂、电子载体、电子供体和酶等要素的反应系统；酶法是被研究和应用最多的再生手段，利用耦合酶催化氧化还原反应，实现辅助因子由氧化态（或还原态）到还原态（或氧化态）的再生；基因工程法则是通过 DNA 操作技术构建含有耦联酶系的工程菌，在完整细胞内完成辅助因子的再生和目的产物的生产。通过辅酶再生还能够简化产物的分离，有利于酶促反应向正反应方向移动。辅助因子的种类和数量很多，常见的辅助因子及其代表性再生方法如表 2-10 所示。

表 2-10 生物转化中常见辅助因子及其原位再生方法

辅助因子	反应类型	代表性再生方法
NAD^+	脱氢	谷氨酸脱氢酶和 α-酮戊二酸
NADH	加氢	甲酸脱氢酶和甲酸
$NADP^+$	脱氢	谷氨酸脱氢酶和 α-酮戊二酸
NADPH	加氢	葡萄糖脱氢酶和葡萄糖
ATP	磷酰基转移	乙酸激酶和乙酰磷酸
糖核苷酸	糖基转移	细菌耦联
辅酶 A	酰基转移	磷酸酰基转移酶和酰基磷酸酯
PAPS	磺酰基转移	芳基磺基转移酶Ⅳ和硝基苯硫酸盐
S-腺苷甲硫氨酸	甲基转移	尚无实例
黄素	氧化	自我再生
磷酸吡哆醛	氨基转移	自我再生
生物素	羧化	自我再生
金属卟啉复合物	过氧化，氧化	自我再生

目前，辅助因子再生的研究和应用主要集中在烟酰胺类辅助因子（NAD（P）H）、ATP、糖核苷酸和 3′-磷酸腺苷 5′-磷酸硫酸（PAPS）等。NAD（P）H 和 ATP 是两个最重要的辅助因子。尤其是前者，它所参与的反应约占待开发酶促反应工艺的 40%。

1. 再生的评价方法 辅助因子再生系统的效率通常用辅助因子的转换数（turnover number，TN），即单位时间内每摩尔辅酶所能得到的目的产物的摩尔数和总转换数（total turnover number，TTN），即每摩尔辅酶所能得到的目的产物的摩尔数衡量。通常认为 TTN 达到 10^3 ~ 10^5 的生物转化工艺在经济上可行。再生体系的效率还可由再生酶及其底物的成本和稳定性、产物分离的难易程度、再生酶的动力学参数（K_{cat}、K_m）、热力学参数等来综合评价。

2. 烟酰胺类辅助因子的再生 其基本原理是氧化态辅酶和还原态辅酶通过加氢或脱氢的氧化还原反应相互转化。一些化学试剂（如吩嗪甲基硫酸盐、吩嗪乙基硫酸盐等）曾用于 NAD^+ 和 NADH 的再生，将 NADH 氧化为 NAD^+，但化学法再生缺乏特异性，辅酶容易被钝化，化学试剂污染产物使分离困难，尤其是对酶促反应所要求的特殊条件难以满足，反应介质严重影响酶的稳定性，已很少有人研究。常用的再生方法包括以下几类。

1）电化学法：通过电极的电子传递直接再生辅助因子，其反应原理为：$NAD^+ + H^+ + 2e = NADH$（图 2-30）。其优点是只用电极而不需要加入任何试剂，但电化学法缺乏特异性，反应速度低，需要高电压才能直接氧化或还原辅助因子，而且电极易沉积污垢，辅助因子易聚合为无活性二聚体以及电极远处的酶无法发挥催化活力。通过电极表面改性和新电子介质可以改善这些不足，如利用吩嗪硫酸二甲酯（phenazinemethosulphate，PMS）作为 NADH 电化学氧化的介质具有最高的速率常数，并且具有可以通过吸附牢固地固定在石墨电极表面的性质。用戊二醛将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶固定在用 PMS 修饰的旋转石墨电极上，通过电化学反应和酶反应可以有效地进行 NAD 循环，将葡萄糖-6-磷酸转变为 6-磷酸葡萄糖酸。

新电子介质应用举例：铑化合物［Cp（Me）$_5$Rh（bpy）Cl］作为电子介体，铑化合物能在较宽 pH 和温度范围保持稳定和活性，电子介质和 NAD^+ 的反应不需要酶催化；基于钌（Ⅱ）和铑（Ⅲ）有机金属化合物的系统，可直接将氢气和烟碱类辅助因子耦联再生。

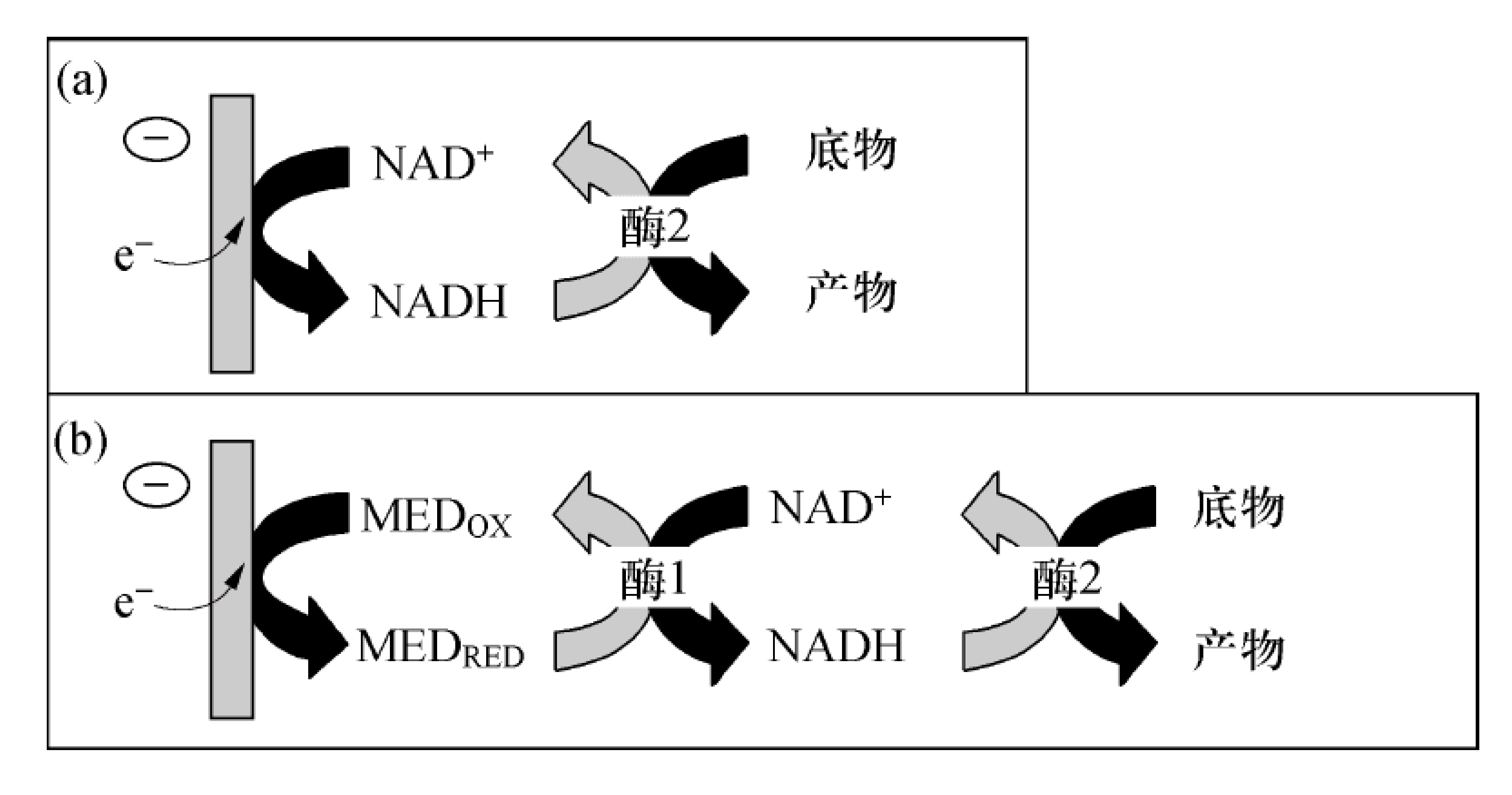


图 2-30　电化学法直接法（a）和间接法（b）辅酶再生循环

MED_{OX} 和 MED_{RED} 分别代表氧化态和还原态的电子介质

2）光化学法：光化学还原再生辅助因子系统包括光敏剂、电子载体、电子供体和酶。反应系统比较复杂，而且阳光是一种漫射能源，光子驱动和伴生的热效应在实际应用将产生相当大的困难。另外，可用的光催化剂也很有限，在这种 $NAD(P)^+/NAD(P)H$ 再生系统中使用的光催化剂也受到一定的限制。虽然它们可以直接大量地廉价合成，但是，有些能够被光化学降解或受到光腐蚀而产生有毒物质如硫化镉。

图 2-31 展示了铁氧化还原蛋白 – $NADP^+$ 还原酶（FDR）、人工电子受体（Mv^{2+}）和光敏剂 $Ru(bpy)_2^{3+}$ 参与的 NAD（P）H 光化学还原再生过程。以大于 400nm 的可见光照射光敏剂 $Ru(bpy)_2^{3+}$ 形成激发态 $^*Ru(bpy)_2^{3+}$，后者向人工电子受体甲基紫精（Mv^{2+}）转移电子形成还原态 Mv^+，Mv^+ 在 FDR 作用下还原 $NADP^+$，被氧化的光敏剂再被牺牲性电子供体 $(NH_4)_3EDTA$ 还原成有活性的还原态，产生的 NADPH 总量与生成的 Mv^+ 相等。

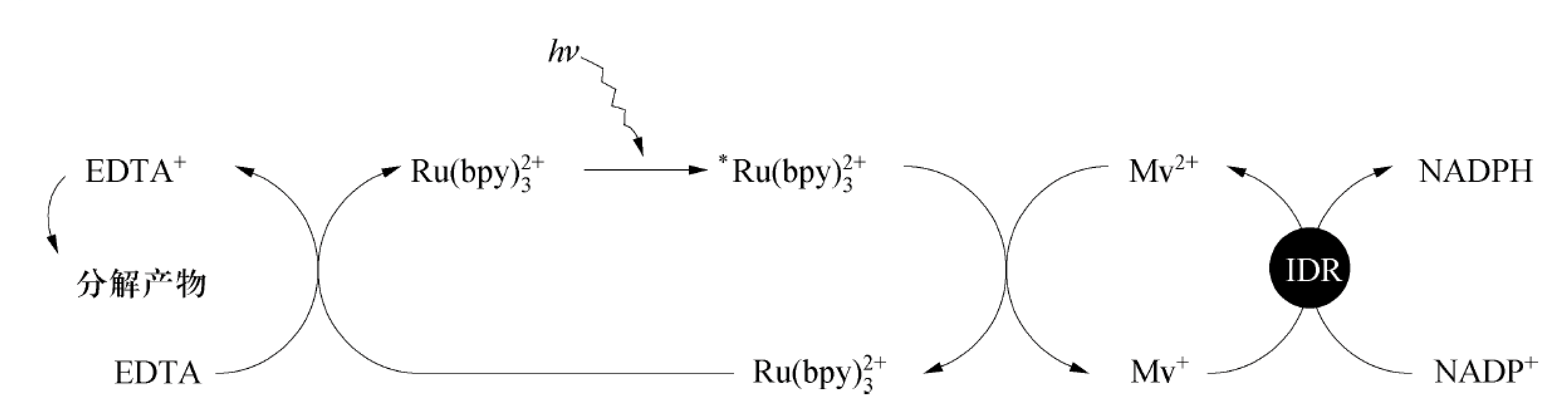


图 2-31　FDR、人工电子受体（Mv^{2+}）和光敏剂 $Ru(bpy)_2^{3+}$ 参与的 NAD(P)H 光化学还原再生

光化学再生的另外一种方法是需要利用整合半导体光催化剂的生物材料。如图 2-32 所示，光激活半导体产生一个电子空穴对，导电带为还原 NAD^+ 提供电子源，而价电子带孔穴能氧化可溶性电子供体。在电子供体（如甲酸盐）存在的情况下，半导体上光致还原可溶性电子载体 Mv^{2+}，然后用硫辛酰胺脱氢酶（LipDH）再生 NADH。若将依赖 NAD^+ 的酶直接固定在半导体上，则没有任何电子载体也能实现 NADH 再生。

3）酶法辅酶再生：指利用酶促反应实现辅酶的再生。通常由合成体系和再生体系两部分组成（图 2-33）。合成体系用来制备目的产物，再生体系则用于辅酶再生。再生中用得最多的酶是脱氢酶，其次是氧化酶等。酶法再生的优点是反应速率快，选择性高，再生体系与合成体系兼容性好，过程易于监控，尤其适合于 NAD（P）$^+$转化为 NAD（P）H 的反应。此类再生系统与需要相应辅助因子的氧化还原酶促反应耦联即可构成烟酰胺辅助因子循环再生

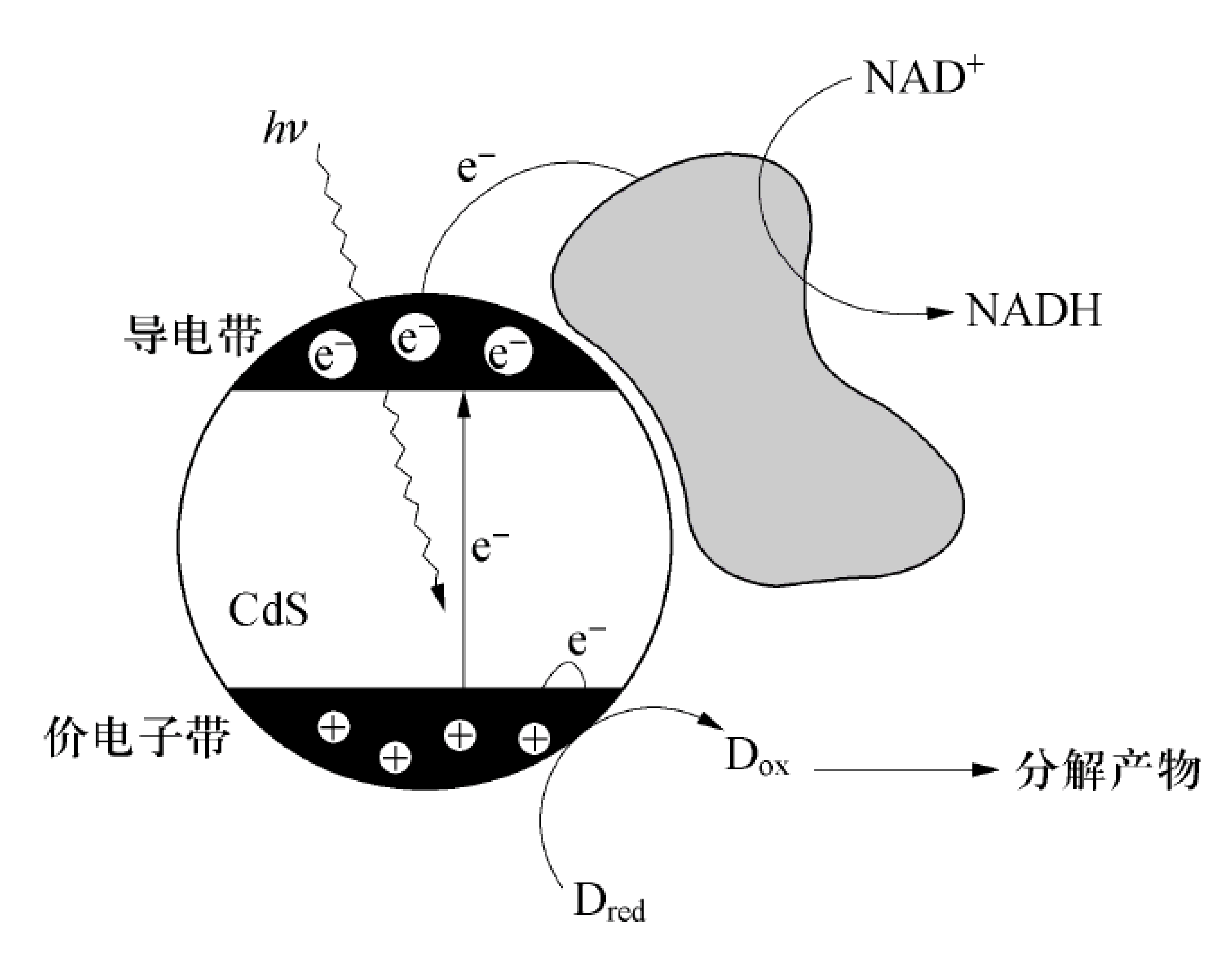


图 2-32　CdS-氢化酶和牺牲电子供体构成了 NADH 光化学再生系统

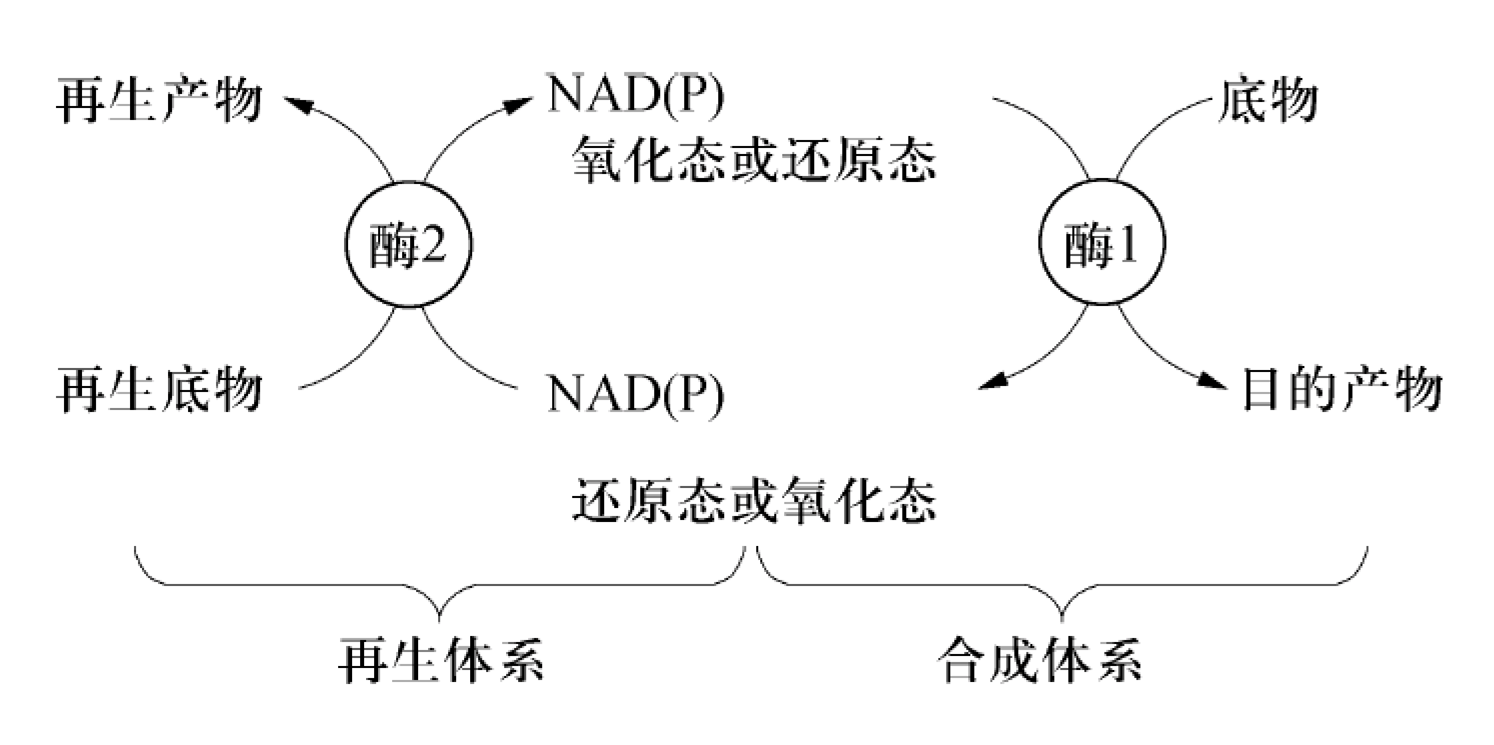


图 2-33　酶耦联的辅酶再生体系

体系，用于生物合成。

（1）还原型的辅酶的再生：用酶法再生还原态的辅酶目前所采用的再生酶包括甲酸脱氢酶（FDH）、葡萄糖脱氢酶（GDH）、醇脱氢酶和氢化酶等。各种酶的用途、反应及优点、缺点如表 2-11 所示，其中尤以 FDH 应用最广，但是一般情况下只能对 NADH 进行再生。ADH 由于价格低廉且种类繁多也常用于还原型辅酶的再生。醇/ADH 再生体系应用范围广，除了能再生 NADH，对 NADPH 也具有再生能力。乙醇是常用的还原剂，在 ADH 的作用下转化为乙醛，同时将 $NAD(P)^+$ 还原，产物分离比较容易，常采用氮气吹扫除去生成的乙醛避免其引起酶失活。

表 2-11　还原态辅酶再生的常见酶系

酶	用　途	反　　应	优　　点	缺　　点
甲酸脱氢酶（FDH）	NADH 再生	甲酸生成 CO_2	甲酸和 CO_2 无毒易去除，已有商业化产品	酶成本高，活力低，不能对 NADPH 再生
葡萄糖脱氢酶（GDH）	NAD（P）H 再生	氧化葡萄糖为葡萄糖内酯，自发转变为葡萄糖酸	稳定性好，对 $NAD(P)^+$ 均有很高的比活力	价格昂贵，产物分离困难
醇脱氢酶（ADH）	NAD（P）H 再生	氧化乙醇生成乙醛	价格适中，乙醇和乙醛具挥发性易于去除	活力低，乙醇和乙醛若不及时去除会抑制酶活力
氢化酶	NADH 再生	分子氢直接氧化 NAD^+ 转化为 NADH	还原能力强，对酶和辅酶无毒，无副产物	稳定性差，对氧敏感，无商业化产品

亚磷酸脱氢酶（PTDH）是近年来新发现的一种酶，在利用 PTDH 再生 NAD(P)H 的过程中，亚磷酸转化为磷酸（图 2-34）。此再生方法由于具有成本低、对酶的活力影响小、适宜 pH 范围广等优势，越来越受到学者们的重视。

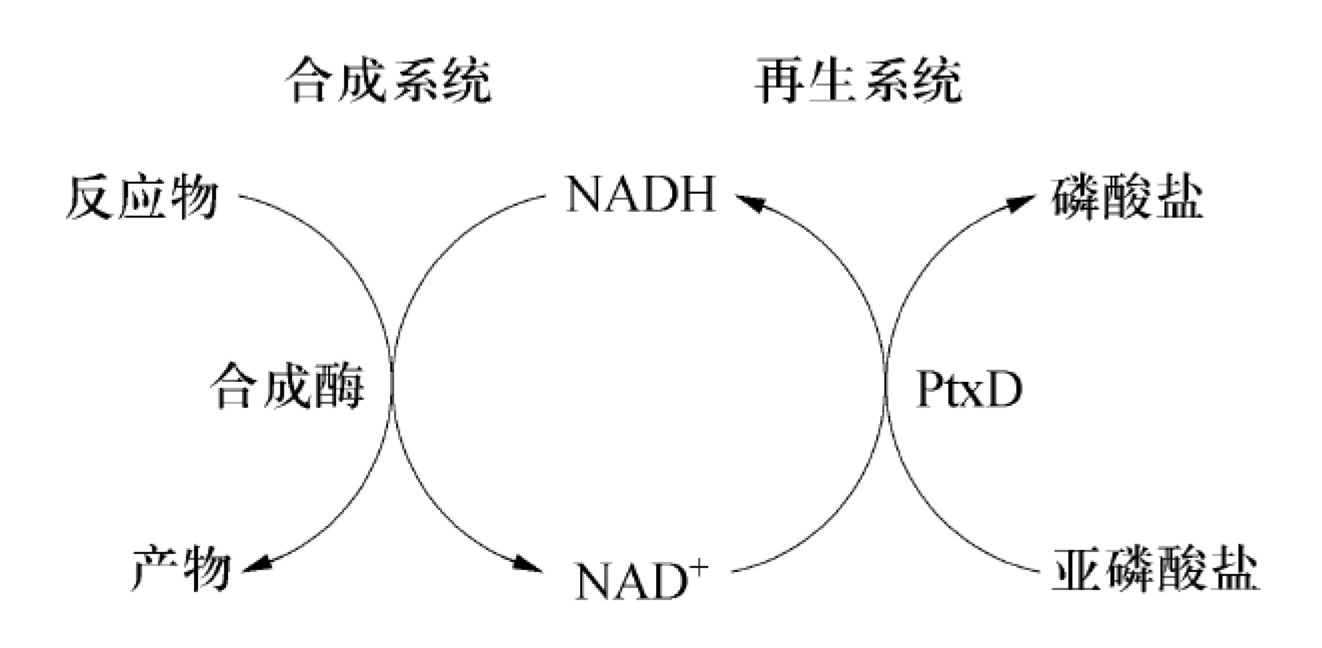


图 2-34　亚磷酸脱氢酶催化的辅酶再生体系

（2）氧化态辅酶的再生：酶法再生氧化态辅酶常采用酶耦联再生方法，一般常用的底物和酶组合为：α-酮戊二酸和谷氨酸盐脱氢酶，丙酮酸和乳酸脱氢酶，乙醛和酵母乙醇脱氢酶或者 NADH 氧化酶。其中，NADH 氧化酶是极具潜力的氧化态辅酶再生体系之一，在实际应用中，依赖 NAD^+ 的 *R* 型特异乙醇脱氢酶（ADH）可以在 *R*，*S*-1-苯基乙醇中让 *R* 型对映体完全氧化，从而生产纯的 *S* 对映体，NADH 氧化酶与此过程耦合，为 ADH 提供再生 NAD^+。此外，研究者也在开发用于氧化态辅酶的再生的新酶。例如铁氧还原蛋白 $NADP^+$ 还原酶（FNR）能够催化 NADPH 氧化再生 $NADP^+$。

氧化态辅酶 $NAD(P)^+$ 在溶液中比还原态辅酶稳定，但利用脱氢酶再生 $NAD(P)^+$ 却比再生 NAD（P）H 困难得多，研究得也较少，迄今为止，尚无工业化的方法，但 $NAD(P)^+$ 的再生却在制备某些普通合成很难得到的手性酮时极为重要。目前常用来再生 $NAD(P)^+$ 的脱氢酶有谷氨酸脱氢酶（GluDH）、乳酸脱氢酶（LDH）、醇脱氢酶（ADH），分别以 α-酮戊二酸（α-ketoglutarate）、丙酮酸（pyruvate）、乙醛（aldehyde）为氧化剂。α-酮戊二酸/谷氨酸脱氢酶体系被认为是这几种方法中较好的，这是因为 α-酮戊二酸/谷氨酸脱氢酶具有很高的氧化电势，而且 α-酮戊二酸和谷氨酸脱氢酶价格低，稳定性好，对酶的活力没有影响。

除脱氢酶外，其他氧化还原酶亦可以用于辅酶再生。各种酶的用途、反应及优缺点如表 2-12 所示。

表 2-12　氧化态辅酶再生的常见酶体系

酶	用　途	反　　应	优　　点	缺　　点
谷氨酸盐脱氢酶	$NAD(P)^+$ 再生	α-酮戊二酸还原生成谷氨酸 α-酮戊二酸还原生成 α-氨基己二酸	常用的再生体系，可以结合生产有用的产物 α-氨基己二酸	酶成本高
乳酸脱氢酶	NAD^+ 再生	丙酮酸还原生成 *L*-乳酸	酶比活力高，酶源廉价	氧化还原能力低，不能再生 $NADP^+$
酵母乙醇脱氢酶	NAD^+ 再生	乙醛还原生成乙醇	价格适中，乙醇和乙醛具有挥发性，易于去除	酶易失活，乙醇和乙醛若不及时去除会抑制酶活力
NADH 氧化酶	NAD^+ 再生	与氧反应生成水或过氧化氢	副产物为水时对反应无影响	无商业化产品，产物为过氧化氢时需加入过氧化氢酶

4）利用整个生物细胞：生物细胞中含有多种酶和辅酶，利用整个细胞作为催化剂可进行化合物的合成。若在反应中加入含碳化合物作为能源，可将细胞中的辅酶再生。体系中，辅酶再生和产物合成均在细胞内部进行，底物必须通过细胞膜到达细胞内部与酶结合，所生成的产物也需从细胞扩散到溶液中，反应受扩散阻力的影响。这种方法比较简单，采用廉价的糖类化合物作为能源因而成本较低，目前也已实现工业化，但此法存在的困难是：①酶活力弱；②底物和产物必须具有渗透性才能够穿过细胞膜；③底物或产物可能会对细胞生长产生抑制作用；④细胞对底物或产物的降解；⑤反应混合物的分离和纯化。

酶法再生体系应用到微生物细胞内，从而达到人们需要的生物转化要求。辅酶再生领域的典型的例子就是贝克酵母。贝克酵母是第一个用于生产手性还原羰基化合物的微生物，它作用的底物范围广，在很多情况下具有好的或者高的对映和非对映异构选择性。在贝克酵母为媒介的还原反应中，NAD(P)H 作为质子供体在细胞内从其对应的氧化形式连续再生。

通过代谢调控改变细胞内辅酶的再生途径，能够改变细胞的代谢功能和氧化还原酶生物催化的产品构成。例如构建 NADH 氧化酶过量表达的 *Lactococcus lactis* 菌株，获得的 NADH 氧化酶能够将 NADH 氧化为 NAD^+。在基因工程菌株 *L. lactis* 细胞中过量表达 150 倍原始菌株的 NADH 氧化酶，降低了细胞内 $NADHP/NAD^+$ 的比率，从而使葡萄糖在耗氧分解代谢过程中从单一的乳酸发酵转变为混合酸发酵。

3. 其他辅助因子再生实例

1）ATP/NTP 再生：磷酰基转移的酶促反应一般都需三磷酸核苷酸（NTP）参与，ATP 最为常用。NTP 价格昂贵，所以发展经济有效的 ATP/NTP 再生系统对于许多生物活性化合物的合成必不可少。现有的方法都是利用耦联酶反应。常用的酶有 3 种：酯酸激酶、丙酮酸激酶和多磷酸激酶（PPK）。用酵母菌、产氨棒杆菌或产氨短杆菌进行全细胞 ATP 再生已有报道（图 2-35）。

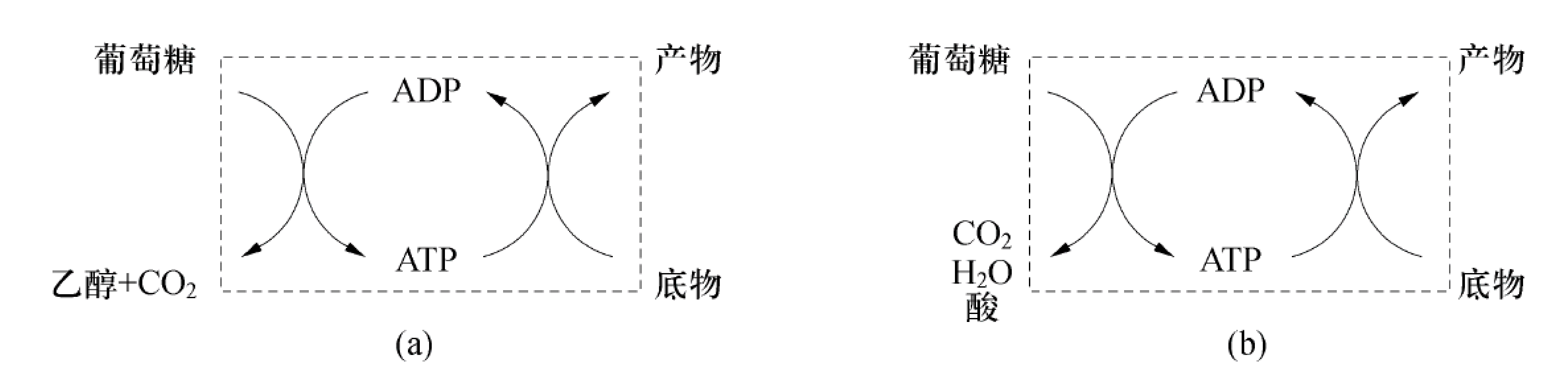


图 2-35 全细胞 ATP 再生示意图

（a）酵母菌；（b）产氨棒杆菌

ATP 再生的另一个途径是利用多聚磷酸盐［poly(P)］，由 AMP 再生 ATP。多聚磷酸盐是正磷酸盐的线性聚合体，含有高能磷酸键，稳定性高，价格低。ATP 再生系统包括 poly（P）、AMP 磷酸转移酶（PAP）和腺苷酸激酶（AdK）。它已成功用于己糖激酶合成葡萄糖-6-磷酸；同时使用黄色黏球菌（*Myxococcusxanthus*）的 PAP 和大肠杆菌重组 PPK，从 AMP 和 poly（P）再生 ATP。通过与乙酰辅酶 A 合成酶耦合，已成功用于乙酰辅酶 A 合成，系统添加无机焦磷酸酶可减轻 PPi 的抑制作用，并提供额外的推动力，如图 2-36 所示。

2）糖核苷酸再生：具有高度区域和立体选择性的糖基转移酶在大规模制备寡糖中具有重要价值。然而糖基转移酶需要糖核苷酸作为辅助因子，也需要原位再生。寡糖生物合成中涉及多种糖基转移酶，但糖核苷酸在哺乳动物中只涉及 9 种：UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcUA、CMP-NeuAc、GDP-Man、GDP-Fuc、UDP-GlcNAc、ADP-Xyl 和 UDP-GalNAc。

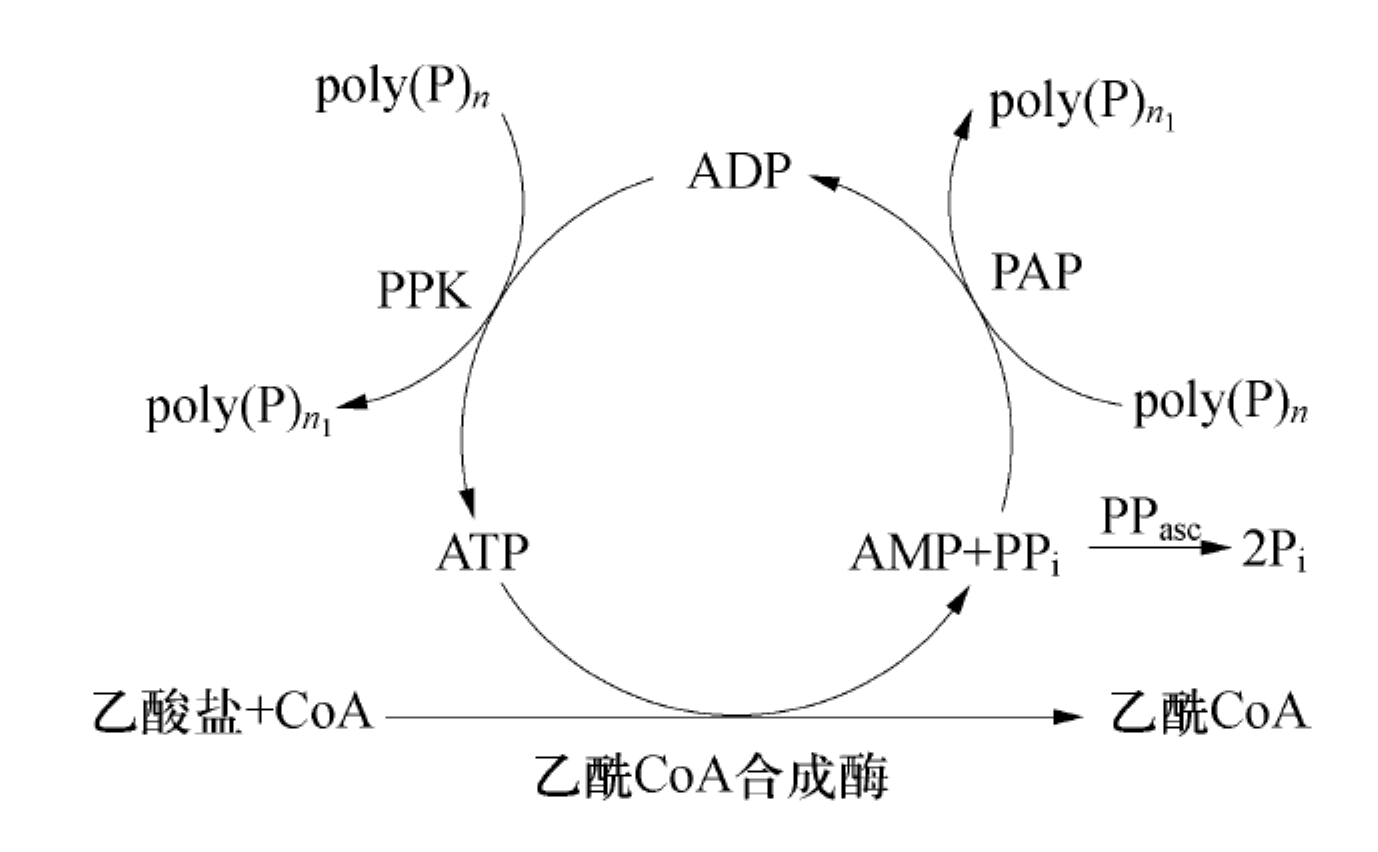


图 2-36　PAP-PPK-ATP 再生系统与乙酰辅酶 A 合成酶及无机焦磷酸酶催化反应耦联

糖核苷酸再生方法中最引人注目的是细菌耦联法。例如，从乳清酸生成 UTP 的产氨棒杆菌与表达糖核苷酸合成酶的重组大肠杆菌之间的细菌耦联（图 2-37）。这种方法已成功应用于糖核苷酸生产，包括 CMP-NeuAc、DP-GlcNAc 和 GDP-Fuc；通过联合产氨棒杆菌和两种重组大肠杆菌可以得到 CMP-NeuAc。这两种重组菌株分别表达 CTP 合酶（转化 UTP 到 CTP）和 CMP-NeuAc 合酶（转化 NeuAc 和 CTP 成为 CMP-NeuAc）。CMP-NeuAc 或 GDP-Fuc 再生系统与糖基转移酶重组大肠杆菌相耦联，就可以大规模生产唾液酸三糖、球形三糖和 Lewis X 等重要寡糖。同样的方法也可以用来生产 NeuAc。

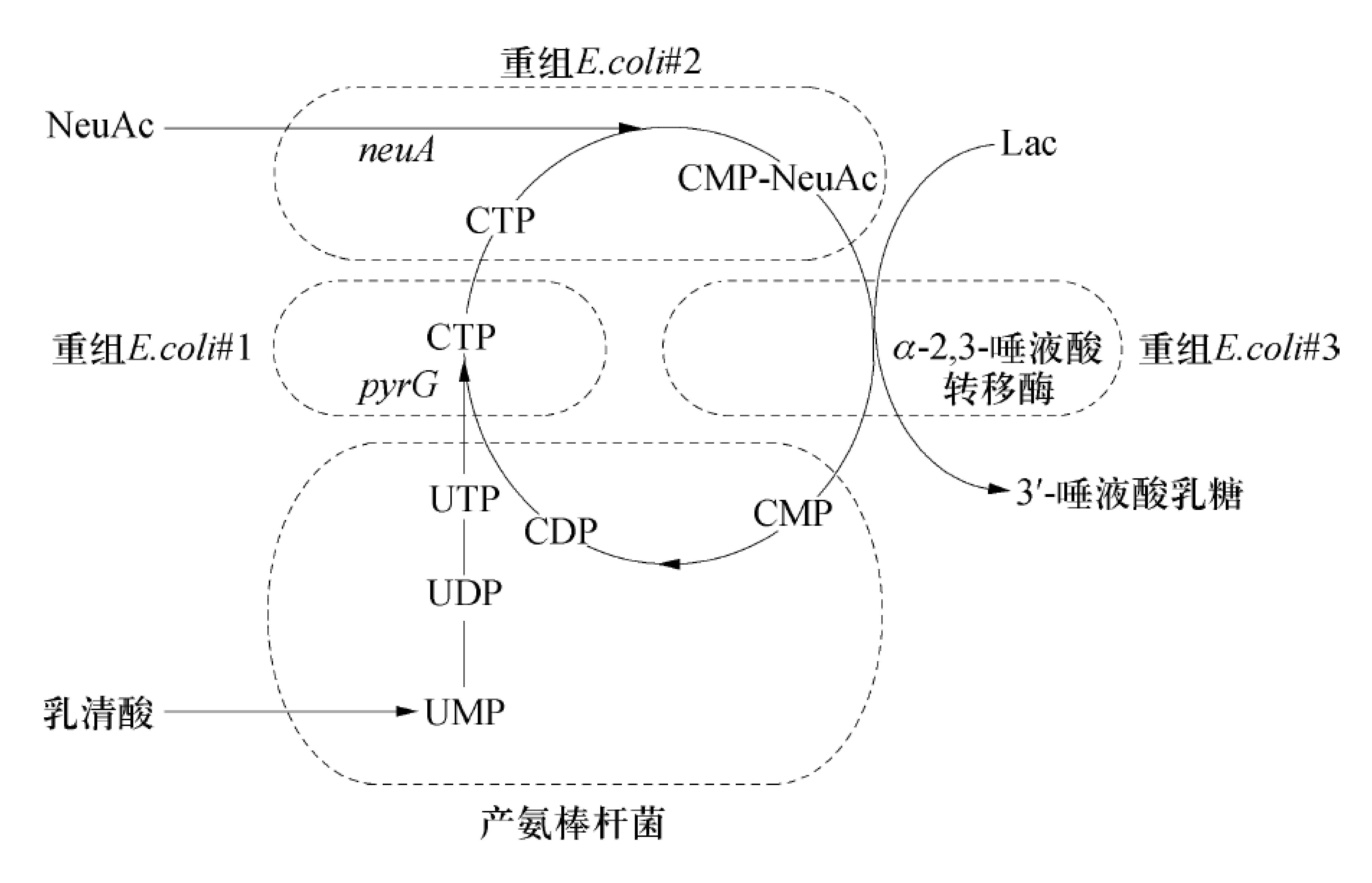


图 2-37　CMP-NeuAc 再生体系

细菌耦联法是一种较经济的糖核苷酸再生方法。但由于过程中同时使用多种菌株，菌株间中间产物的运输和同时维持不同菌株生长都可能给实际应用带来困难。新方法只采用一种同时含有糖核苷酸再生和寡糖合成所需的全部酶的超级重组菌（superbug）将其用于 CMP-NeuAc 再生。

3）PAPS 再生：辅助因子 3′-磷酸腺苷-5′-磷酸硫酸（PAPS）是生物系统内通用的硫酸盐供体。磺基转移酶催化合成一些重要糖和糖肽硫酸盐反应中都需要 PAPS 参与。由于 PAPS 价格昂贵、不稳定以及在应用时容易受产物抑制影响，相关生产应用中需对 PAPS 进行原位再生。最早的 PAPS 酶法再生是一个复杂多酶体系，它由 ATP 硫酸化酶、APS 激酶、3′-核苷酸酶、肌酸激酶和丙酮酸激酶组成。它模仿天然的代谢循环过程，硫酸盐先转移形

成 ATP，ATP 再被 ATP 硫酸化酶和 APS 激酶转化为 PAPS。最近出现了一种 PAPS 的单酶再生系统，如图 2-38 所示。这种方法使用重组的鼠肝芳基磺基转移酶Ⅳ，并用 *p*-硝基苯酚硫酸酯盐（*p*-nitrophenyl sulfate）作为硫酸盐供体。它被认为是目前制备硫酸糖（carbohydrate sulfate）的最有效方法。

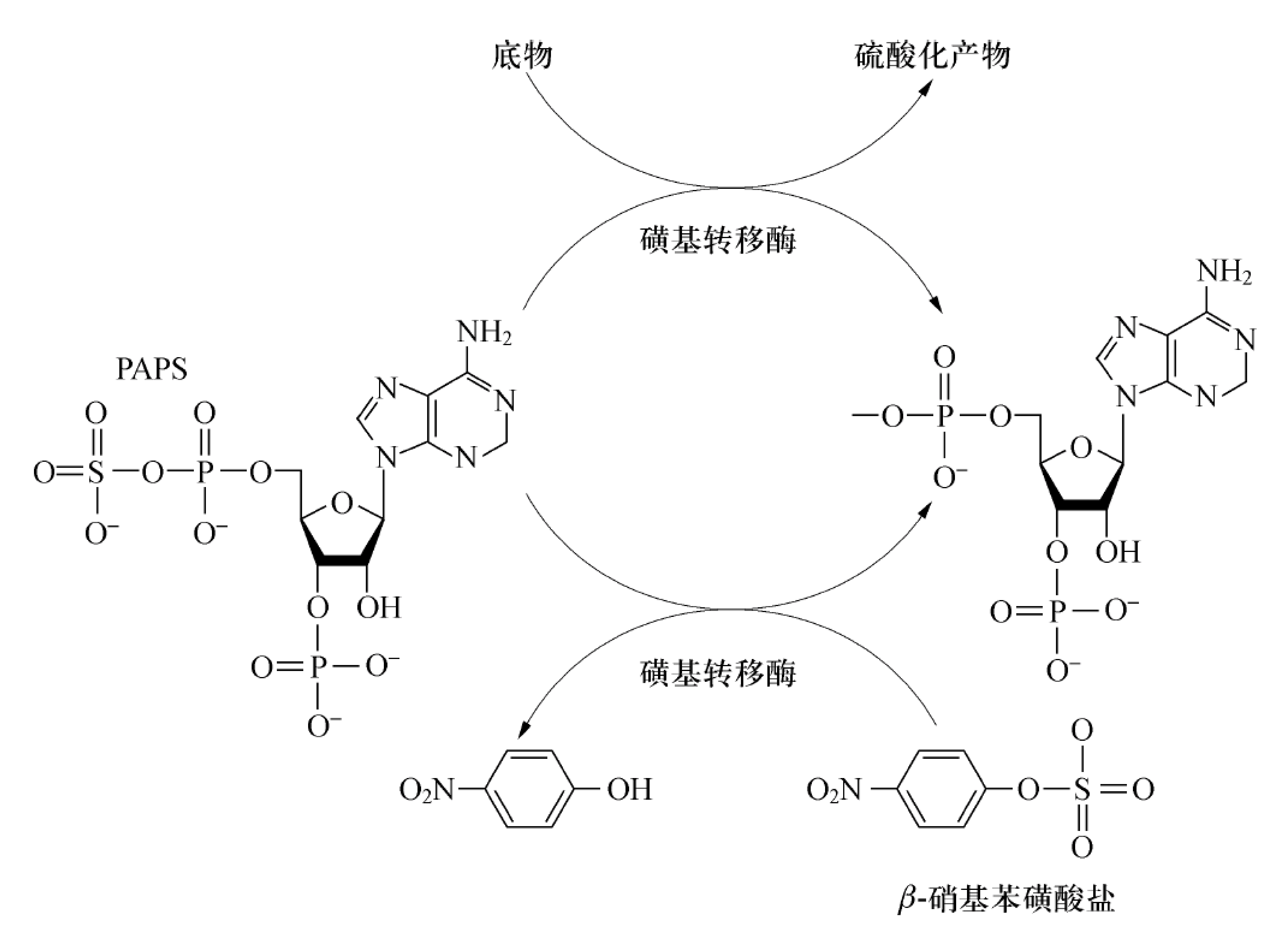


图 2-38　重组的鼠肝芳基磺基转移酶和 *p*-硝基苯酚硫酸酯盐构成的 PAPS 单酶再生系统

4. 辅酶再生研究的发展方向　有效的辅酶再生系统必须包括两个方面：氧化还原力的供给以及它们的有效传递。从氧化还原力供给来看，酶学方法是通过第二底物 P 酶或者第二底物 P 第二酶系统来为辅酶再生提供氧化还原力的，其重点在于选择高效、低廉的第二底物和第二酶，且对系统没有影响和有利于产物分离。从氧化还原力的传递来看，电化学方法最需要解决的关键问题就是构建高效的电子传递链，实现氧化还原力的不断转移。酶法中自由酶方法基本不存在传递阻力，但是需要通过酶的固定化或者膜反应器使酶限制在体系内，使氧化还原力的利用效率更高。而对于整体细胞的方法，氧化还原力的传递问题是它自身的缺陷，但由于其价格低廉以及对一些特殊反应的适应性，它也是辅酶再生的重要应用方法。

除了常规的辅酶再生系统，研究人员还在不断探索效率更高、功能更集成的辅酶再生方法。例如，辅酶的再生循环还可以通过在同一种蛋白质内表达两种酶活力来实现，形成复合功能的融合酶。此外，对于微生物转化体系，辅酶往往处于一种精细的平衡状态，仅仅依靠单一细胞内再生途径的改造、强化无法实现大量再生，这就需要借助于其他细胞产生辅酶的体系。日本协和发酵株式会社开发了通过高产 ATP 和消耗 ATP 的两种不同休眠细胞之间的耦合实现 ATP 再生的技术，已在 GTP 的工业化生产上取得成功。

2.7　酶反应工程应用

1. 酶反应工程在化工领域中的应用　人们已经开始利用酶催化反应来生产很多化工产品，如衣康酸、柠檬酸等有机酸以及丙烯酰胺、长链二元酸、1, 3-丙二醇、聚羟基丁酸酯等

化工单体或聚合物。

以 1, 3-丙二醇为例，它是一种重要的化工原料，主要用途为可提高产品的性能，能作为医药和有机合成的中间体；作为单体用于合成聚酯、聚氨酯，以 1, 3-丙二醇为单体生产的聚对苯二甲酸丙二酯（PTT）是一种新型聚酯材料，具有易染色、弹性好、柔软性优良、悬垂性好、低静电、可生物降解等优点，国外已把 PTT 列为 21 世纪的新型纤维材料之一。微生物可以利用甘油脱水酶在辅酶 B_{12} 存在下将甘油转化为中间产物 3-羟基丙醛，然后在 NADH 存在下，在 1, 3-PD 氧化还原酶催化下生成 1, 3-丙二醇。通过对 1, 3-丙二醇生物法合成途径的反应进行调控，可以大大提高 1, 3-丙二醇的产量和生产效率。2003 年杜邦公司因开发的基因工程菌利用可再生葡萄糖合成 1, 3-丙二醇获得了美国总统绿色化学奖（www. cen-online. com, June，24，2003）。由 DuPont、Tate&lyle 和 Genencor 公司联合建立的年产大约 45000kg 的中试发酵装置已投入运转，该装置以湿玉米为原料，利用基因工程菌生产 1, 3-丙二醇。

丙烯酰胺是重要的有机化工原料，其均聚物和各种共聚物统称聚丙烯酰胺（PAM），绝大部分的丙烯酰胺都用来制造聚丙烯酰胺。PAM 最有价值的性能是相对分子质量很高（10^3 ~ 10^7），水溶性强，可以制作出亲水而水不溶性的凝胶，可以引进各种离子基团并调节相对分子质量以得到特定的性能，对许多固体表面和溶解物质有良好的黏附力。微生物催化水合法技术是国内外近年来发展较快的技术，利用腈水合酶催化丙烯酰胺的合成。经过一系列的菌种选育及培养条件的研究，腈水合酶的合成速率大大提高并抑制了酰胺酶的合成，使腈水合酶酶活力达到了 363U。1985 年，日本日东化学公司在横滨利用山田实验室的成果，建设世界上第一个利用微生物年生产 4000 吨丙烯酰胺的工业性实验装置。第二代工业化菌种用于日东化工的生化装置后，年产量达到 6000 吨。1991 年的第三代菌种 *Rhodococcus Rhodochrous* J1（总酶活力为 1630U）使该生化装置年产量上升到 20000 吨。从 1985 年日本建立第一个工业装置算起，丙烯酰胺的生产实现了质的飞跃，基本取代了传统的化学生产方法。

2. 酶反应工程在医药领域中的应用

1）手性化合物的认识与发展：手性（chirality）指一个有机分子形成两种空间排布方式不同的对映异构体，互成镜像，不能重合。光学纯的手性化合物指单一对映异构体的手性化合物。在生物体中，具有重要生理意义的活性物质大多数都具有旋光性，并仅以一个对映体存在。生物大分子，如蛋白质、多糖、核酸和酶等，几乎都是手性的。生物体中构成蛋白质的氨基酸都是*L*-构型，天然存在的单糖则多为 *D*-构型，生物体中 DNA 都是右手螺旋结构。

药物的有效生物活性也与手性立体结构密切相关。经过多年对许多手性化合物的对映异构体的深入研究，研究人员认识到手性化合物的对映体构型与药效有非常重要的关系，许多手性药物的药理和生理作用多与体内相应靶分子之间的手性匹配和分子识别能力有关。一般手性药物只有其中一个对映体具有生理活性。含手性结构药物的 2 个对映体，其生物活性往往存在很大差异，可以相差数十倍、数百倍甚至完全相反的药理作用或毒性。目前用具有对映立体选择性的脂肪酶作催化剂，对外消旋药物的光学拆分或光学活性药物的合成已成为生物化学研发的重要领域。例如 *R*-天冬酰胺有甜味，而天然的 *S*-天冬酰胺则是苦的；*S*-（+）2 香芹酮有芫荽的香味，而其 *R*-异构体则有留兰香的香味；*R*-苎烯有橘子香味，而其 *S*-异构体则有柠檬香味；左旋抗坏血酸（即维生素 C）可用于治疗坏血病，而其右旋体则无效；*L*-四咪唑是驱虫剂，*D*-四咪唑有毒又不能驱虫；舞毒蛾性引诱素是舞毒蛾的性信息素，其一种对映异构体在极稀的浓度就有活性，而另一异构体即使在极高的浓度也无活性；β-受体阻

断药 *S*-普萘洛尔（propranolol）比其 *R*-异构体的活性高 98 倍；非甾体抗炎药 *S*-萘普生（naproxen）的活性比其 *R*-异构体高 35 倍。表 2-13 列举了常见的手性药物对映体的不同药理作用。

表 2-13　手性药物两种对映体的药理作用

药物名称	有效对映体的作用	另一种对映体的作用
普萘洛尔（propranolol）	*S* 构型，治疗心脏病，β-受体阻断药	*R* 构型，钠通道阻滞药
萘普生（neproxen）	*S* 构型，抗炎、解热、镇痛	*R* 构型，疗效很弱
青霉素胺（penicillamine）	*S* 构型，抗关节炎	*R* 构型，突变剂
羟基苯哌嗪（dropropizine）	*S* 构型，镇咳	*R* 构型，有神经毒性
沙立度胺（thalidomide）	*S* 构型，镇静药	*R* 构型，致畸胎
酮基布洛芬（ketoprofen）	*S* 构型，抗炎	*R* 构型，防治牙周病
喘速宁（trtoquinol）	*S* 构型，扩张支气管	*R* 构型，抑制血小板凝集
乙胺丁醇（ethambutol）	*S* 构型，抗结核病	*R* 构型，致失明
萘必洛尔（kebivolol）	右旋体，治疗高血压，β-受体阻断药	左旋体，舒张血管

1992 年，美国 FDA 明确要求必须说明具有手性特性的化学药物其两个对映体在体内的不同生理活性、药理作用以及药物代谢动力学情况。许多国家和地区也都制定了有关手性药物的政策和法规。这大大推动了手性药物拆分的研究和生产应用。一半以上的药用化合物都具有不止一个手性中心，而药政管理部门规定手性药物对映体的纯度要大于 99.5%，除生物催化外，用其他方法要得到大于 95% 的对映体纯度非常困难。根据有关机构调查，目前提出注册申请和正在开发的手性药物中，单一对映体药物占绝大多数。手性药物已成为国际新药研究与开发的新方向之一。与此同时，手性问题在营养保健品、食品、饲料添加剂、农药及其他精细化学的领域中也开始受到关注和重视。可以说，以单一异构体形式产品上市是手性药物及其他手性化合物的发展趋势，这也是生产企业和科技工作者面临的挑战和机遇。

2）生物催化制备手性药物或手性中间体化合物：作为生物催化剂的 6 大类酶，水解酶由于来源广泛、无需辅酶或辅助因子、成本低廉、稳定性较好、能耐受的底物浓度较高，因此应用面最广，占 65% 左右，其缺点是水解酶催化的反应多数为对映体拆分，理论得率最高只有 50%，需要设法将不需要的对映异构体消旋后重复使用；其次是氧化还原酶体系，约占 25%，还原酶能催化各种羰基的不对称还原反应，一般立体选择性较高，而且理论产率可达 100%，缺点是酶的稳定性较差，一般不能耐受太高的底物浓度，而且辅酶再生比较麻烦，成本也较高。因此，经常使用廉价的细胞作为生物催化剂。随着基因技术的推广应用，使得氧化还原酶（包括用于辅酶再生的酶）的表达水平大幅度提高，酶的相对成本大幅度下降；此外，随着各种膜技术的发展，使得产物的原位分离变得更加切实可行，因此，使用氧化还原酶系进行手性产品不对称合成的实例逐渐增多，特别是被用于生产一些批量不大、附加值较高的手性药物中间体。当然，氧化还原酶也可用于外消旋混合物的去消旋化反应，水解酶催化的对映选择性反应中，通过与金属催化的原位消旋反应进行耦合，也能达到不对称合成的理论产率（100%）。而其他几种酶（如转移酶、裂解酶、异构酶、连接酶）

在医药工业上的利用率较低，总共不到 10% 。

（1）水解酶催化对映选择性合成反应：微生物脂肪酶在水解反应中使用较多，最为常见的商品酶制剂有：假丝酵母脂肪酶（CRL）、假单胞菌属脂肪酶（PSL）、南极假丝酵母脂肪酶（CAL）等猪胰脂肪酶（PPL）、猪肝酯酶（PLE）或马肝酯酶（HLE）也偶有报道。一些蛋白酶同样能选择性水解羧酸酯，使用较多的有 *α*-胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶，其他还有胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等。此外，青霉素酰化酶也可用于对映选择性水解手性的羧酸酯或酰胺。酯酶或蛋白酶催化的手性底物酯可分为两种类型：Ⅰ型酯为手性羧酸与非手性醇构成的酯；Ⅱ型酯为手性醇与非手性羧酸构成的酯。无论是哪种类型的手性酯，都要求手性中心尽可能在反应位点的附近，酶才能显示其手性识别的能力。因此，一般的酶在催化拆分 *α*-取代的手性酸或手性仲醇时，效果较好，而在拆分 *β*-取代的手性酸或手性伯醇时，效果一般不太理想。为了提高酶反应的速度，一般要求酯的非手性醇基或手性酸基部分尽可能小，并且最好带有吸电子基团。例如，Ⅰ型酯的醇基部分常使用甲基、乙基、甲氧基甲基、氰甲基、卤乙基等，而Ⅱ型酯的酰基部分则常使用乙酰基、丙酰基、丁酰基及卤代乙酰基等。

（2）非水介质中手性化合物的酶促拆分与合成反应：非水介质中酶催化反应的发展提供了一种合成手性化合物的新方法。脂肪水解酶和蛋白水解酶等在有机溶剂中对某些手性化合物表现出高度的立体选择性，使它们在手性化合物的拆分及催化合成方面显示出广阔的应用前景。用外消旋的氨基酸或酯作为酰基供体，用 *α*-胰凝乳蛋白酶和木瓜蛋白酶催化合成了一系列光活性寡肽。并以外消旋的苯丙氨酸甲酯及丙氨酸环己酯作为酰基受体，在嗜热杆菌蛋白酶催化作用下得到了两种光活性甜二肽，利用酶促不对称酰化作用可以拆分消旋酰基化合物和消旋醇。

（3）微生物或酶的手性拆分：微生物或酶法拆分已经广泛使用。用水解酶类如脂肪酶、酯酶、蛋白酶、酰胺酶、腈水合酶、酰化酶等，对外消旋底物进行不对称水解或合成，使其拆分以得到手性化合物。例如，采用酰基转移酶Ⅰ（acylase Ⅰ）拆分化学合成的消旋体 *N*-酰基-氨基酸来制取对映体纯 *D*-或 *L*-构型氨基酸，在氨基酸工业生产上是非常重要的方法。

将化学合成的 *D*，*L*-氨基酸乙酰化后，用米曲霉的酰基酶水解拆分，可得到 *L*-氨基酸和 *D*-乙酰氨基酸。*D*-异构体可经消旋反复利用再拆分，理论上可得到 100% 的单一异构体，用此方法也可获得非天然的 *D*-氨基酸（如 *D*-丙氨酸，Pfizer 公司人工甜味剂 alitame 的成分）。这是比较经典的酶法拆分方法，这种方法几乎适用于所有合成法生产的 *D*，*L*-氨基酸的拆分。由于合成 *D*，*L*-氨基酸成本低，不少 *L*-氨基酸可以用酶法拆分制备。利用氨基酰化酶进行乙酰 *D*，*L*-氨基酸不对称水解反应，然后再利用生成的 *L*-氨基酸与 *N*-酰化-*D*-氨基酸的溶解度之差进行分离所制得的 *L*-氨基酸光学纯度好、收率高，而且 *D* 型组分很容易消旋化。1955 年这种方法就已用于工业生产，1969 年日本制药开始采用固定化酶装置连续生产。固定化米曲霉（*Asploryzae*）产生的氨基酰化酶柱非常稳定（酶活力下降时可补加酶溶液进行简单的再生），使用期大于 5 年。一个 1000L 酶柱月产量 10 ~ 32 吨。此方法适用于多种 *L*-氨基酸的生产。这种方法曾用于生产 *L*-丙氨酸、*L*-蛋氨酸、*L*-色氨酸、*L*-缬氨酸等。我国最近报道筛选了高酶活力的菌种，用于 *L*-蛋氨酸的生产，并较好地解决了 *D*-乙酰蛋氨酸的消旋问题，可望实现大规模工业化生产。

生物催化不对称合成用酶，主要是微生物酶，如氧化还原酶、合成酶、裂解酶、水解酶、羟化酶、环氧化酶等，直接将前体化合物不对称合成或转化多种相应的手性醇、酮、

醛、酸、酯、胺衍生物，以及各种含磷、硫、氮及金属的手性化合物。微生物酶直接合成或转化，很多情况下，可将非手性或手性前体 100% 转化成手性目的产物。甾体化合物微生物氢化可的松、*L*-天冬氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-苹果酸、*L*-酒石酸、*D*-对羟苯甘氨酸等的工业化都是很典型的例子。在合成中引入生物催化技术已越来越受到重视并取得了许多成就，也展示了手性化合物制备的良好前景。固定化细胞方法生产 *L*-天冬氨酸是比较经典的实例，技术已经比较成熟。大肠杆菌（*E. coli*）含有大量的天冬氨酸酶，它能将延胡索酸转化为 *L*-天冬氨酸。细胞经培养发酵后，离心收集菌体，采用卡拉胶固定化细胞。将含天冬氨酸酶的固定化大肠杆菌装填于填充床式反应器中，制成柱式生物反应器生产 *L*-天冬氨酸。

日本日触公司的生产过程已经有了很大改进，用重组大肠杆菌使发酵酶活力由 $10\times10^4U\cdot OD^{-1}$ 提高到 $750\times10^4U\cdot OD^{-1}$，改进固定化方法使固定化细胞酶活力由 $1500U\cdot ml^{-1}$ 提高到 $3000U\cdot ml^{-1}$，生产能力达到 $1m^3$ 固定化细胞每年生产 10000 吨 *L*-天冬氨酸。酶法生产 *L*-赖氨酸也是大规模生物催化不对称合成的生产实例。

用环己烯合成的价廉的 *D*，*L*-α 氨基-ε 己内酰胺（*D*，*L*-ACL）原料（生产尼龙原料己内酰胺副产物），用卢氏隐球酵母（*Cryptococcus laurentii*）生产的水解酶水解其中 *L*-ACL 组分而生成 *L*-赖氨酸，未水解的 *D*-组分可用奥贝无色杆菌（*Achromobacter obae*）等细菌产生的消旋酶（racemase）消旋。两种酶协同作用，酶反应在底物浓度 $0.8mol\cdot L^{-1}$、pH 8.0、温度为 40℃ 条件下反应 25h，转化率几乎 100%，产品光学纯度达到 99.5%。

（4）生物催化不对称氧化还原反应：本反应在手性合成中有着非常重要的应用。脱氢酶被广泛用于醛或酮的羰基以及烯烃碳碳双键的还原，这种生物催化反应可使潜手性底物转化为手性底物。甲酸脱氢酶（FDH）广泛用于 NADH 的循环再生，它使甲酸氧化生成 CO_2，同时使氧化态辅酶 NAD^+ 还原为 NADH。工业化应用的实例是德国 Degussa 公司利用亮氨酸脱氢酶（LeuDH）催化三甲基丙酮酸不对称还原合成 *L*-叔亮氨酸，使用 FDH 酶再生辅酶 NADH。该反应的转化率为 74%，生产强度达 $638g\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$，产品可用做抗肿瘤药物和艾滋病病毒蛋白酶抑制药物，目前生产能力达到年产吨级规模。

另一种常用的 NADH 或 NADPH 再生系统是利用葡萄糖脱氢酶（GDH）催化氧化葡萄糖为葡萄糖内酯或葡萄糖酸。芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.），例如蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌等，一般都含有 GDH 酶，且稳定性较好，并对 NAD^+ 或 $NADP^+$ 都有很高的比活力。例如，美国施贵宝公司在利用白地霉（*Geotrichum candidum*）脱氢酶不对称还原 4-氯 2,3-羰基丁酸甲酯合成（*S*）2,4-氯 2,3-羟基丁酸甲酯时，使用 GDH 酶再生反应所需的辅酶 NADPH。该反应的底物浓度为 $10g\cdot L^{-1}$，产率为 95%，光学纯度为 99%，反应规模 750L，生产能力为千克级。产品可用做降胆固醇药（HMG CoA 还原酶抑制剂）的手性起始原料。通过微生物细胞内的酶系进行转化，不需要对酶进行提纯，也不需额外添加昂贵的辅酶，因而减少了工序并降低了成本，但发酵终产物较为复杂，副产物相对增加。在生物催化不对称还原反应制备手性药物或其中间体的研究开发中也有不少相当好的实例。例如链孢霉菌（*Neurospore crassa*）转化雌酮制备雌二醇是甾体激素合成中所应用的典型微生物催化还原反应。又如礼来公司在治疗神经退行性疾病的左旋体药物 Talampanel 的关键手性合成步骤采用生物催化法，使用鲁氏结合酵母（*Zygosaccharoyces rouxii*）ATCC14462 催化不对称还原反应，减少合成步骤，总产率由原来的 16% 提高到 51%，降低了生产成本。同时，生物催化法避免使用大量有机溶剂和产生大量重金属铬污染物，减少污染，对环境友好。该项研究获 1999 年美国总统绿色化学挑战奖。基因工程手段应用于生物催化也取得了显著成果，例如，

通过在大肠杆菌中联合表达掷孢酵母的乙醛还原酶（AR）和巨大芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶等相关酶基因，进行生物催化不对称还原，使得（*R*）2, 4-氯 2, 3-羟基丁酸乙酯的最高浓度达 268g · L^{-1}，转化率为 94. 1%，光学纯度达 91. 7%。国内许多单位也开展了生物催化的不对称氧化还原反应的研究工作，例如进行生物催化不对称还原反应合成卤代羟基酸的研究，选育了高立体选择性和还原活性的菌株出芽短梗霉（*Aureobasidiumpullulans*）CG MCC1244，研究在单一水相体系和水 – 有机溶剂两相体系中的不对称还原，在没有添加辅酶和葡萄糖脱氢酶的条件下，产物（*S*）-4-氯 2, 3-羟基丁酸乙酯在单一水相系中的浓度可达 20. 3g · L^{-1}。在两相体系中，有机相产物浓度达到了 56. 8g · L^{-1}，转化率为 94. 8%，产物光学纯度均大于 97%。

生物催化的氧化反应主要包括单加氧酶、双加氧酶和氧化酶。其中单加氧酶反应需要辅酶的参与，它使分子氧（O_2）中的一个氧原子加入到底物分子中，而另一个氧原子使还原型 NADH 或 NADPH 氧化，生成 H_2O。单加氧酶催化的反应类型包括烷烃或芳香烃的羟化（生成醇或酚）、烯烃的环氧化（生成环氧化合物）、含杂原子化合物中杂原子的氧化以及酮的氧化（Baeyer-Villiger 反应，生成酯或内酯）。双加氧酶能催化 O_2 分子中 2 个氧原子都加到一个底物分子中，典型的反应包括：烯烃的过氧化反应（例如大豆脂氧酶、辣根过氧化酶）和芳烃的双羟基化反应。氧化酶催化电子直接转移到分子氧中，生成水或过氧化氢，主要类型有：黄素蛋白氧化酶（如氨基酸氧化酶、葡萄糖氧化酶）、金属黄素蛋白氧化酶（如醛氧化酶）、血红素蛋白氧化酶（如过氧化氢酶、过氧化物酶）等，它们虽然在食品和环保方面具有广泛的应用，但在手性合成中的应用却不多见。在生物氧化反应的工业应用中，最经典的例子当为甾体的微生物羟化反应，我国自 20 世纪 50 年代开始研究，目前仍有人在从事这方面的技术改进工作。

本章小结

作为生物催化剂的酶具有专一性、高效性、反应条件温和及可调节性等特点，在各个领域中均有广泛应用。酶促反应动力学是研究酶促反应速度及其影响因素的科学。这些因素主要包括酶的浓度、底物的浓度、pH、温度、抑制剂和激活剂等。

米氏方程用于描述酶促反应中底物浓度与反应速度的关系，$v = V_{max}c_S/(K_m + c_S)$，其中 V_{max} 指该酶促反应的最大速度，c_S 为底物浓度，K_m 是米氏常数，v 是在某一底物浓度时相应的反应速度。米氏常数 K_m 值等于酶反应速度为最大速度一半时的底物浓度，单位为浓度单位，反应酶与底物的亲和力大小，是酶的特征性常数之一，其大小只与酶的性质有关。

特定的 pH 条件最适合酶、底物和辅酶互相结合，并发生催化作用，使酶促反应速度达最大值，这种 pH 值称为酶的最适 pH。酶促反应速度最大时的温度称为酶的最适温度，最适 pH 和酶的最适温度不是酶的特征性常数，它受底物浓度、缓冲液的种类和浓度以及酶的纯度等因素的影响。

凡能使酶的活力下降而不引起酶蛋白变性的物质称做酶的抑制剂。使酶变性失活（称为酶的钝化）的因素如强酸、强碱等，不属于抑制剂。通常抑制作用分为可逆性抑制和不可逆性抑制两类，其中可逆性抑制又分为竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制。不同抑制条件下，酶促反应的动力学常数都有所改变。能使酶活力提高的物质，都称为激活剂，其中大部分是离子或简单的有机化合物。

固定化酶具有极易与底物、产物分离，可以在较长时间内进行反复分批反应和装柱

连续反应，在大多数情况下稳定性提高，酶反应过程能够加以严格控制等优势。酶的固定化，不仅使酶的活力发生了变化，而且由于固定化酶的引入，反应体系变为多相体系。因此，在研究固定化酶催化反应动力学时，还要考虑物质的质量传递对酶催化反应过程的影响。为提高固定化酶外扩散效率，应设法减小 Da 准数。为提高固定化酶内扩散效率，应设法减小 φ。

酶可以在水与有机溶剂的互溶体系中进行催化反应。如脂肪酶在有机溶剂中具有很高的热稳定性和较高的催化活力，水对维持酶的活力结构是必不可少的，但只要保证酶分子表面的一小部分必需水，其他大部分水完全可以被有机溶剂取代而不影响酶的活力。酶在非水相催化中有很多成功的应用实例，在非水相催化方面，酶也具有广阔的应用前景。

使用氧化还原酶进行生物催化时，合成产物的同时会消耗一定量的辅酶，如何保证辅酶的高效供应是开发氧化还原酶催化反应的关键技术之一。化学法、电化学法、光化学法可用于辅酶的再生研究；酶法是被研究和应用最多的再生手段，利用耦合酶催化氧化还原反应，实现辅助因子由氧化态（或还原态）到还原态（或氧化态）的再生；基因工程法则是通过 DNA 操作技术构建含有耦联酶系的工程菌，在完整细胞内完成辅助因子的再生和目的产物的生产。通过辅酶再生还能够简化产物的分离，有利于酶促反应向正反应方向移动。

参考文献

岑沛霖，关怡新，林建平. 2005. 生物反应工程. 北京：高等教育出版社
陈石根，周润琦. 2001. 酶学. 上海：复旦大学出版社
贾士儒. 2008. 生物反应工程原理. 北京：科学出版社
科林根. 2007. 精编蛋白质科学实验指南. 北京：科学出版社
马兰戈尼. 2007. 酶催化动力学——方法与应用. 赵裕蓉译. 北京：化学工业出版社
山根恒夫. 2006. 生物反应工程. 北京：化学工业出版社
施巧琴. 2005. 酶工程. 北京：科学出版社
孙志浩. 2005. 生物催化工艺学. 北京：化学工业出版社
王镜岩，朱圣庚，徐长法. 2002. 生物化学. 北京：高等教育出版社
谢进金，张继平，王勤，等. 2006. 锯缘青蟹 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶在甲醛溶液中的失活动力学研究. 厦门大学学报（自然科学版），45（1）：98～101
袁勤生，赵健. 2005. 酶与酶工程. 上海：华东理工大学出版社
张玉彬. 2002. 生物催化的手性合成. 北京：化学工业出版社

习　题

1. 试述磺胺药物能够抑制细菌生长的原理。
2. 影响酶促反应的因素有哪些？用曲线表示并说明它们各有什么影响？
3. 有淀粉酶制剂 1g，用水溶解成 1000ml，从中取出 1ml 测定淀粉酶活力，测知每 5 分钟分解 0.25g 淀粉，计算每克酶制剂所含的淀粉酶活力单位数（淀粉酶活力单位规定为：在最适条件下，每小时分解 1g 淀粉的酶量为 1 个活力单位）。

4. 试比较酶的竞争性抑制作用与非竞争性抑制作用的异同。

5. 什么是米氏方程？米氏常数 K_m 的意义是什么？试求酶促反应速度达到最大反应速度的 99% 时所需求的底物浓度（用 K_m 表示）。

6. 酶降低反应活化能实现高效率的重要因素是什么？

7. 和非酶催化剂相比，酶在结构和催化机制上有什么特点？

8. 试述维生素与辅酶、辅基的关系，维生素缺乏症的机制是什么？

9. 固定化酶和游离酶相比，有何优、缺点？

10. 为什么酶制剂的生产主要以微生物为材料？

11. 下面是某人对酶测定的一些数据，据此求出该酶的最大反应速度和米氏常数。

c_S（$mol \cdot L^{-1}$）	v_0（$\mu mol \cdot min^{-1}$）
0.5×10^{-6}	28
4.0×10^{-6}	40
1.0×10^{-5}	70
2.0×10^{-5}	95
4.0×10^{-5}	112
1.0×10^{-4}	128
2.0×10^{-4}	139
1.0×10^{-2}	140

12. 酶进行化学修饰时，应考虑哪些因素？

13. 列出用共价结合法对酶进行固定化时酶蛋白上可和载体结合的功能团。

14. 某酶的初提取液经过一次纯化后，经测定得到下列数据，试计算比活力、回收率及纯化倍数。

	体积（ml）	活力单位（$U \cdot ml^{-1}$）	蛋白氮（$mg \cdot ml^{-1}$）
初提取液	120	200	2.5
硫酸铵沉淀	5	810	1.5

15. 酶的抑制剂分哪两类？概述每个类型的动力学特征。

16. 影响固定化酶反应速度的因素有哪些？

第 3 章　微生物反应质能平衡与计量

【重要概念】

黑箱模型、微生物反应平衡式、元素平衡方程、呼吸商、还原度、得率系数、菌体得率、代谢产物得率、反应热

引言

基因工程和代谢工程技术的飞速发展为现代发酵工程领域提供了很多高产菌株，对提高发酵水平和生产率有很大的促进作用，但是，如何通过优化控制使发酵工程产品生产最优化仍然是发酵工程领域中存在的主要问题之一。微生物发酵过程优化控制的主要方式是建立过程模型和制定优化控制策略与算法。其中，过程模型的建立首先要考虑质能平衡原理。

微生物反应的本质是化学反应。在生长过程中，微生物从周围环境摄取各种营养物质，通过各种生化反应合成细胞的结构物质、获取能量、形成各种代谢产物。尽管微生物的生长是一个精细且复杂的过程，但仍然遵循质量和能量守恒定律。在微生物代谢过程中，碳、氢、氧、氮以及其他元素会在错综复杂的生物反应中进行重新组合，对每一种元素来说，用于合成细胞物质或代谢产物的元素总消耗量等于环境中该元素的损失量。从表观上看，微生物某些代谢产物的生成量往往与某些基质（底物）的消耗量或者其他代谢产物（如 CO_2）的生成量呈一定的比例关系。在物质代谢的同时，微生物不断地从环境获得或放出能量，但微生物和环境的总能量保持不变。

根据质量和能量平衡定律，可以对微生物反应过程进行计量。在实际生产中，从培养基设计到微生物反应的优化控制都涉及计量学原理。微生物反应质能平衡的计量是研究反应过程的一个有效手段，对解决工程问题特别有用。在发酵过程中，利用质能平衡理论可以预测各种基质的需要量，从而更经济有效地利用它们，减少无效消耗。质能平衡理论是解除发酵过程中某种基质限制或抑制，实现过程优化的重要手段。例如，利用微生物反应平衡式可以将微生物反应中可以在线检测的参数和不可测定的参数联系起来，有助于分析反应过程；通过质量和能量衡算，可以了解反应物和生成物之间的定量关系、反应过程需要消耗和释放多少能量等，对于代谢调控的分析有重要意义。在通常情况下，对生物反应器进行分析时，计量学知识对于表述反应器物质平衡和建立反应动力学模型非常关键。

3.1　物质平衡

3.1.1　黑箱模型

微生物反应不同于一般的化学反应。在微生物反应中，所涉及的参与反应的营养成分很

多，而且反应途径很复杂，在细胞生长的同时还伴随着代谢产物的形成，微生物反应还会受到环境条件或者培养方式的影响，因此，对于微生物反应来说，很难像化学反应一样用标以正确系数的反应方程式来精确表示从基质到产物的整个反应过程。为了研究微生物生长、产物生成和底物消耗的数量关系，在微生物反应计量学中提出了“黑箱模型”的概念。该模型将细胞生长系统看作一个与环境进行物质交换的“黑箱”，不考虑黑箱内的反应过程，单纯研究黑箱的最初和最终状态以及输入和输出物流的变化，将细胞进行的众多反应看成是一个有多种反应物参与、生成多种产物的复合反应（图 3-1）。

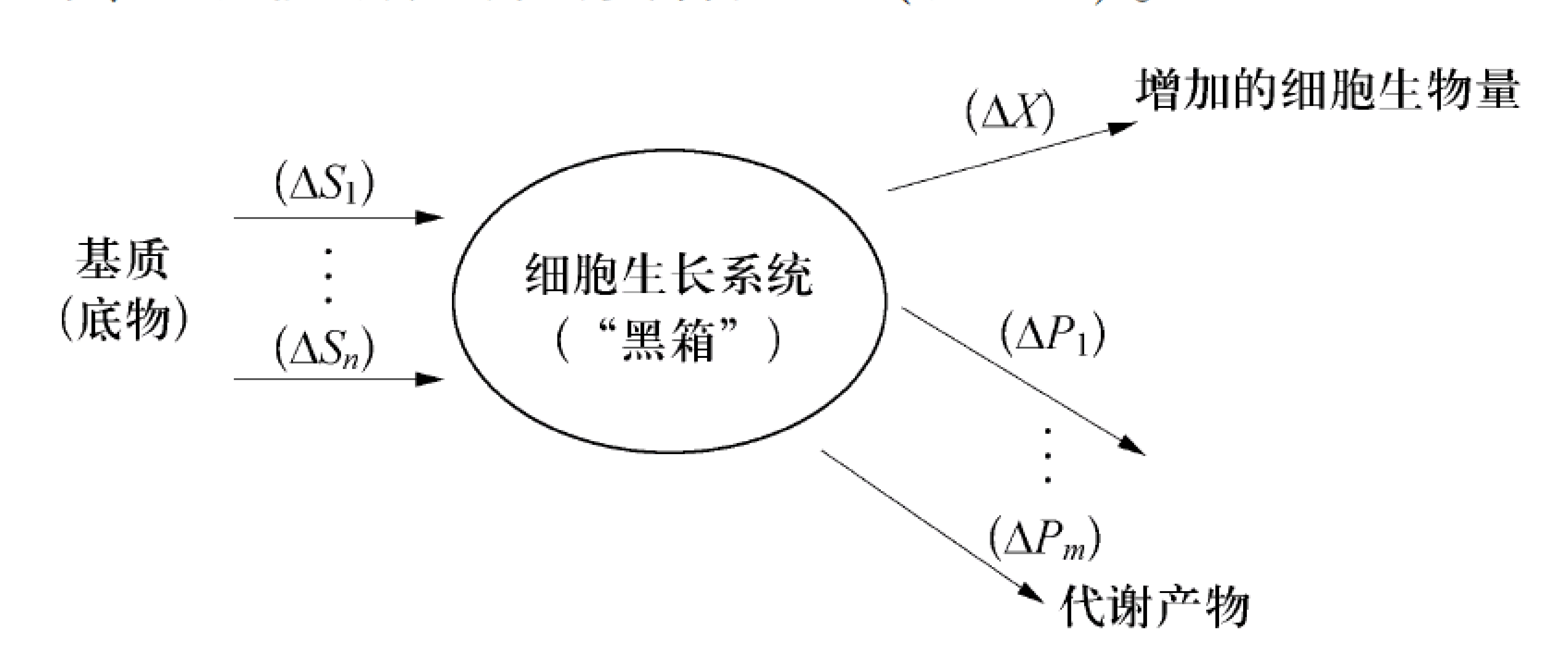


图 3-1　微生物反应“黑箱模型”示意图

用 ΔS 表示不同的基质，ΔX 表示新增细胞生物量，ΔP 表示不同的代谢产物

在微生物生长代谢过程中，将细胞生长系统看做“黑箱”（或化学反应的“催化剂”），培养基质转化成更多的细胞生物量并形成代谢产物。

3.1.2　元素平衡方程

根据“黑箱模型”（图 3-1），微生物反应可以表述为

$$\text{营养物质（碳源、氮源、氧、无机盐等）} \xrightarrow{\text{微生物}} \text{新的细胞物质 + 代谢产物} \tag{3-1}$$

在不同环境中，由于不同微生物甚至同一微生物所利用的营养物质和形成的产物千差万别，式（3-1）并不能表示微生物反应的计量关系。但是，微生物反应遵循质量守恒定律，某种元素用于合成细胞物质或代谢产物的量等于环境中该元素的损失量。因此，对参与微生物反应的各种元素进行衡算，就可以表示出细胞生长和代谢产物积累的计量关系。为建立元素平衡方程，要对微生物反应过程进行一定的简化处理。

（1）虽然微生物营养需求具有多样性，而培养基组成也十分复杂，但影响微生物细胞生长和产物合成的主要营养物质是碳源和氮源，在元素衡算时，一般认为只有一种有机碳源和一种无机氮源参与微生物反应，分别表示为 CH_mO_n 和 NH_3。

（2）微生物细胞之间或者同一细胞在不同生长阶段，其细胞物质组成都有所不同，但参与微生物反应的细胞数量巨大，在元素衡算时，可以用细胞的平均物质组成来表示。由于元素 C、H、O 和 N 是构成细胞的主要成分，其他元素组成在细胞生长和产物积累过程中变化很小，因此，细胞可以用分子式 $CH_xO_yN_z$ 表示其组成。

（3）微生物反应的代谢产物主要包括有机物、CO_2 和 H_2O。类似于对微生物细胞组成的简化，将有机代谢产物的元素组成表示为 $CH_uO_vN_w$。

上述分子式中，下标 m、n、u、v、w、x、y、z 表示与一个碳原子相结合的 H、O、N 的原子数。简化后，微生物生长和产物形成的反应平衡式可以表示为：

$$CH_mO_n + aO_2 + bNH_3 \longrightarrow cCH_xO_yN_z + dCH_uO_vN_w + eH_2O + fCO_2 \tag{3-2}$$

分别对 C、H、O 和 N 进行元素衡算，可以得到如下方程组：

$$\begin{cases} C: & 1 = c + d + f \\ H: & m + 3b = xc + ud + 2e \\ O: & n + 2a = yc + vd + e + 2f \\ N: & b = zc + wd \end{cases} \tag{3-3}$$

利用元素平衡方程，可以计算微生物反应的计量关系，建立相关的反应平衡式。

例 3-1 某细菌以葡萄糖为碳源生长时，能够产生乙醇，反应平衡式如下所示。求计量关系中的系数 a、b、c 和 d。

$$C_6H_{12}O_6 + aNH_3 + 1.875O_2 \longrightarrow bCH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}(\text{菌体}) + cC_2H_5OH + dH_2O + 2.5CO_2$$

解 根据元素平衡方程，可以得到：

$$\begin{cases} C: & 6 = b + 2c + 2.5 \\ H: & 12 + 3a = 1.8b + 6c + 2d \\ O: & 6 + 2 \times 1.875 = 0.5b + c + d + 2 \times 2.5 \\ N: & a = 0.2b \end{cases}$$

由以上方程求解得

$$\begin{cases} a = c = 0.5 \\ b = 2.5 \\ d = 3 \end{cases}$$

所以，上述反应的计量关系式为

$$C_6H_{12}O_6 + 0.5NH_3 + 1.875O_2 \longrightarrow 2.5CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}(\text{菌体}) + 0.5C_2H_5OH + 3H_2O + 2.5CO_2$$

3.2 微生物反应的呼吸商和还原度

配平微生物反应平衡方程式（3-2）时，一部分系数是由实验测得的，另一部分系数需要计算获得。其中，基质和代谢产物的分子式通常是已知的，而微生物菌体的分子式（即细胞的元素组成）可以通过元素分析进行确定。表 3-1 列出了几种常见微生物的无灰分干燥菌体的元素组成。

表 3-1 几种常见微生物细胞的经验分子式（$CH_xO_yN_z$）

微生物	分子式	微生物	分子式
Escherichia coli	$CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$	*Saccharomyces cerevisiae*	$CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17}$
Klebsiella pneumonia	$CH_{1.62}O_{0.42}N_{0.24}$	*Candida utilis*	$CH_{1.62}O_{0.48}N_{0.16}$
Penicillium simplicissimum	$CH_{1.79}O_{0.44}N_{0.11}$	*Candida brassicae*	$CH_{1.78}O_{0.51}N_{0.15}$
Pseudomonas sp. C12B	$CH_{2.00}O_{0.52}N_{0.23}$	*Rhizopus oryzae*	$CH_{1.78}O_{0.62}N_{0.18}$

在确定了全部反应物和产物的分子式之后，微生物反应平衡方程中还有 a、b、c、d、e、f 六个未知的计量系数需要确定。要想求取全部计量系数，除了 4 个元素平衡方程式（3-3）以外，尚需建立其他关系式。为此，引入了呼吸商和还原度的概念。

呼吸商（respiratory quotient，RQ）定义为细胞反应中每消耗 1mol O_2 所产生的 CO_2 的摩尔数，表示为

$$RQ = \frac{CO_2 \text{ 生成速率}}{O_2 \text{ 消耗速率}} \tag{3-4}$$

根据式（3-2），可得

$$RQ = \frac{f}{a} \tag{3-5}$$

f、a 是待求的计量系数。呼吸商是好氧培养中评价微生物代谢机能的重要指标之一，可以用专门的呼吸商测定仪确定。

例 3-2　以葡萄糖为基质，对酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）进行好氧培养，其反应方程式为：

$$C_6H_{12}O_6 + aNH_3 + bO_2 \longrightarrow cCH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17} + dH_2O + eCO_2$$

已测得该反应的呼吸商 RQ = 1.06，求计量系数 a、b、c、d、e。

解　根据元素平衡方程，可以得到

$$\begin{cases} C: & 6 = c + e \\ H: & 12 + 3a = 1.83c + 2d \\ O: & 6 + 2b = 0.56c + d + 2e \\ N: & a = 0.17c \end{cases}$$

根据 RQ = 1.06，可得

$$e = 1.06b$$

由以上 5 个方程式求解得

$$\begin{cases} a = 0.542 \\ b = 2.655 \\ c = 3.186 \\ d = 3.897 \\ e = 2.814 \end{cases}$$

还原度（degree of reduction）是评价化合物氧化 - 还原水平的指标。在微生物反应计量中，将某一化合物的还原度定义为该化合物中相对于碳原子的有效电子数，即该化合物的有效电子数除以该化合物所含碳原子数，还原度用 γ 表示。所谓有效电子数是指化合物被氧化成 CO_2、H_2O 等产物时所传递给氧的电子数。几种基本元素的还原度定义为：C = 4，H = 1，O = −2，N = −3，S = 6，P = 5。在化合物中，任意元素的还原度同其化合价相同。表 3-2 列出了一些常见化合物的还原度。

表 3-2　一些常见化合物还原度的计算

单质或化合物	有效电子数	还原度
氧气（O_2）	$2 \times (-2) = -4$	−4
二氧化碳（CO_2）	$4 + 2 \times (-2) = 0$	0
氨气（NH_3）	$-3 + 3 \times 1 = 0$	0
甲烷（CH_4）	$4 + 4 \times 1 = 8$	8
葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）	$6 \times 4 + 12 \times 1 + 6 \times (-2) = 24$	4
乙醇（C_2H_5OH）	$2 \times 4 + 6 \times 1 + 1 \times (-2) = 12$	6

在微生物反应计量中，还原度的衡算考虑了对任何化学反应都应该满足的氧化－还原平衡的需要，由此，可以得到一个与反应相对应的还原度衡算方程。由于在微生物反应平衡方程中，NH_3、CO_2 和 H_2O 的还原度都是0，可只考虑 O_2、基质、细胞和代谢产物的还原度，分别是

$$\begin{cases} O_2: & \gamma_O = -4 \\ \text{基质}: & \gamma_S = 4 + m - 2n \\ \text{细胞}: & \gamma_B = 4 + x - 2y - 3z \\ \text{代谢产物}: & \gamma_P = 4 + u - 2v - 3w \end{cases} \tag{3-6}$$

根据氧化还原反应中得失电子数目相等的原理，微生物反应平衡方程两边有效电子数目应该相同，因此，得到相对应的还原度平衡式为

$$\gamma_S - 4a = c\gamma_B + d\gamma_P \tag{3-7}$$

整理得

$$1 = \frac{c\gamma_B}{\gamma_S} + \frac{d\gamma_P}{\gamma_S} + \frac{4a}{\gamma_S} \tag{3-8}$$

即

$$1 = \xi_B + \xi_P + \varepsilon \tag{3-9}$$

式中：ξ_B 表示底物中传递到细胞的有效电子数分数；ξ_P 表示底物中传递到代谢产物的有效电子数分数；ε 表示底物中传递到氧的有效电子数分数。

ε、ξ_B 和 ξ_P 反映了碳源用于产生能量、细胞物质和代谢产物的效率。实验发现，微生物细胞的还原度 γ_B 因微生物种类不同或培养基碳源不同等因素会有所不同，但差别非常小，一般 γ_B 取其平均值为 4.291 ± 0.172。基质和代谢产物的还原度可根据其组成而求出。

这样，在4个元素平衡方程以外，引入了呼吸商和还原度的计算式（式（3-5）和式（3-7）），就满足了微生物反应方程计量系数求解的需求。

例3-3 以葡萄糖为基质，对酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）进行好氧培养，其反应方程式为

$$C_6H_{12}O_6 + aNH_3 + bO_2 \longrightarrow cCH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17} + dH_2O + eCO_2$$

请根据还原度来计算计量系数 a、b、c、d、e。

解 根据元素平衡方程，可以得到

$$\begin{cases} C: & 6 = c + e \\ H: & 12 + 3a = 1.83c + 2d \\ O: & 6 + 2b = 0.56c + d + 2e \\ N: & a = 0.17c \end{cases}$$

根据氧化还原反应平衡的原理，可得

$$24 - 4b = 4.2c$$

由以上5个方程联立求解得

$$\begin{cases} a = 0.542 \\ b = 2.655 \\ c = 3.186 \\ d = 3.897 \\ e = 2.814 \end{cases}$$

3.3　微生物反应的得率系数

在生物反应工程中，通过对微生物反应进行计量学分析，可以得到菌体得率、代谢产物得率、最大得率系数等方便且直观的计量学参数。利用这些参数，不仅可以定量评价细胞消耗某种基质（特别是碳源）来合成细胞自身或目标代谢产物的能力、探索最优培养条件，而且还可以作为细胞生长、基质消耗和产物生成的动力学参数。

3.3.1　微生物反应的菌体得率

菌体得率（cell yield）又称为生长得率（growth yield）或细胞得率系数（yield coefficient，yield factor），根据所使用基准的不同，菌体得率有几种不同的定义方式。

1. 以底物消耗为基准的菌体得率　当以底物消耗为基准时，菌体得率 $Y_{X/S}$ 定义为消耗 1g 或 1mol 基质生成菌体细胞的克数，其定义式为

$$Y_{X/S} = \frac{\text{生成细胞的质量}}{\text{消耗基质的质量}} = \frac{\Delta m_X}{-\Delta m_S} \tag{3-10}$$

式中，Δm_X 和 $-\Delta m_S$ 分别表示菌体和基质的质量改变量，$Y_{X/S}$ 的单位是 $g \cdot g^{-1}$ 或 $g \cdot mol^{-1}$；在生物反应计量中所提到的细胞质量都是指干细胞的质量。对培养基的任一成分，都可以用式（3-10）来定义 $Y_{X/S}$，但实际上多以碳源为基质来定义。从 $Y_{X/S}$ 的定义可以看出，如果实际生产的目的是获得单细胞蛋白，则应选用 $Y_{X/S}$ 高的菌种进行发酵。

分批培养时，反应体系中菌体和基质的浓度时刻在发生改变，在这种情况下，菌体得率通常不能被看做常数。为此，将某一瞬间的菌体得率定义为微分菌体得率（或瞬时菌体得率），表示为

$$Y_{X/S} = \frac{dm_X}{-dm_S} = \frac{\frac{dm_X}{dt}}{\frac{-dm_S}{dt}} = \frac{r_X}{r_S} \tag{3-11}$$

式中，r_X 为菌体生长速率，r_S 为基质消耗速率，都以质量基准（$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）为单位。将分批培养的总菌体得率表示为

$$Y_{X/S} = \frac{c_{X_{st}} - c_{X_0}}{c_{S_0} - c_{S_{st}}} \tag{3-12}$$

式中，c_{X_0} 和 c_{S_0} 分别为初始菌体量和初始基质浓度，$c_{X_{st}}$ 和 $c_{S_{st}}$ 分别为反应结束时的菌体量和基质浓度。

$Y_{X/S}$ 与微生物和基质的种类有关，也与培养条件有关（表 3-3）。同一菌株在相同培养基上生长时，好氧培养的 $Y_{X/S}$ 大于厌氧培养的 $Y_{X/S}$。对于同一菌株，分别在基本培养基、合成培养基和复合培养基中培养时，菌体得率 $Y_{X/S}$ 按上述培养基顺序递增。

当微生物反应服从反应平衡式（3-2）中的计量关系时，菌体得率可表示为

$$Y_{X/S} = \frac{M_X \cdot c}{M_S};\quad Y_{X/O_2} = \frac{M_X \cdot c}{M_{O_2} \cdot a} \tag{3-13}$$

式中，M_X 和 M_S 分别表示菌体和基质的一碳相对分子质量，Y_{X/O_2} 是消耗 1g O_2 所获得的菌体量，M_{O_2} 表示 O_2 相对分子质量，a、c 是式（3-2）中的计量系数。由此可见，反应平衡式中

表 3-3　几种微生物的菌体得率 $Y_{X/S}$ *

微生物	培养基	培养条件	碳　源	产　物	$Y_{X/S}$（以细胞/基质计）（$g \cdot mol^{-1}$）
Lactobacillus casei	复合	厌氧	葡萄糖	乳酸、乙酸、乙醇、甲酸	62.08
Streptococcus agalactiae	复合	厌氧	葡萄糖	乳酸、乙酸、乙醇	21.4
	复合	需氧	葡萄糖	乳酸、甲酸、3-羟基丁酮	51.6
Zymomonas mobilis	复合	厌氧	葡萄糖	乙醇、乳酸	7.95
	合成	厌氧	葡萄糖	乙醇、乳酸	4.98
	基本	厌氧	葡萄糖	乙醇、乳酸	4.09
Aerobacter aerogenes	基本	需氧	葡萄糖	乙醇、乳酸	72.7
	基本	需氧	果糖	乙醇、乳酸	76.1
	基本	需氧	核糖	乙醇、乳酸	53.2
	基本	需氧	琥珀酸	乙醇、乳酸	29.7
	基本	需氧	乳酸	乙醇、乳酸	16.6

* 以碳源为基质。

的计量系数也可以通过测定菌体得率来确定。

例 3-4　某微生物以十六烷为碳源生长时，其反应平衡式为

$$C_{16}H_{34} + 12.4O_2 + 2.09NH_3 \longrightarrow 2.42C_{4.4}H_{7.3}O_{1.2}N_{0.86} + 11.45H_2O + 5.33CO_2$$

求该微生物反应的菌体得率 $Y_{X/S}$ 和 Y_{X/O_2}。

解　根据式（3-13），以菌体/十六烷计算 $Y_{X/S}$，可得

$$Y_{X/S} = \frac{2.42 \times (4.4 \times 12 + 7.3 \times 1 + 1.2 \times 16 + 0.86 \times 14)}{16 \times 12 + 34 \times 1} = 0.978\ (g \cdot g^{-1})$$

$$Y_{X/O_2} = \frac{2.42 \times (4.4 \times 12 + 7.3 \times 1 + 1.2 \times 16 + 0.86 \times 14)}{12.4 \times (2 \times 16)} = 0.557\ (g \cdot g^{-1})$$

2. 以碳元素消耗为基准的菌体得率　一般情况下微生物反应都是以碳源为主要基质，无论在需氧还是在厌氧条件下进行的微生物反应，碳源的主要消耗途径有两个：一是被同化为细胞组分，即产生生物量；二是被异化为 CO_2 和其他代谢产物，维持微生物生存和生成代谢产物的消耗。在任何反应中，转化率或者得率都是一个很关键的指标，为了表示碳源同化为细胞组分的转化效率，可采用以碳元素消耗为基准的菌体得率 Y_C 来表征，其意义为新生菌体所含碳原子的质量与基质所含碳原子的质量之比，即

$$Y_C = \frac{\text{生成细胞的质量} \times \text{细胞含碳量}}{\text{消耗基质的质量} \times \text{基质含碳量}} = \frac{\Delta m_X}{-\Delta m_S} \cdot \frac{\sigma_X}{\sigma_S} = \frac{\sigma_X}{\sigma_S} Y_{X/S} \quad (3\text{-}14)$$

式中：Y_C 是消耗 1g 底物碳原子所获得的菌体碳原子的质量；σ_X 和 σ_S 分别是单位质量菌体和单位质量基质中碳原子的质量。在微生物反应平衡式（3-2）中，系数 c 实际上就是 Y_C。（$1 - Y_C$）就表示基质中的碳转化为菌体以外其他物质中碳的分率。

Y_C 值应该小于 1，一般微生物反应的 Y_C 值为 0.4 ~ 0.9。Y_C 的定义中基质消耗和菌体生

成都是相对于同一基准的碳而言，因此，Y_C 比 $Y_{X/S}$更加合理。表 3-4 举出了一些 Y_C 实测值的例子。

表 3-4　几种微生物的 Y_C 实测值

微生物	基　质	Y_C（$g \cdot g^{-1}$）
Klebsiella aerogenes	葡萄糖	0. 49 ~ 0. 56
Candida utilis	葡萄糖	0. 53 ~ 0. 59
Candida utilis	乙醇	0. 58 ~ 0. 68
Candida brassicae	乙醇	0. 47 ~ 0. 54
Mycobacterium phiei	正烷烃混合物（C_{14} ~ C_{17}）	0. 65 ~ 0. 75

例 3-5　已知某细菌以葡萄糖为单一碳源生长时，菌体得率 $Y_{X/S} = 85g \cdot mol^{-1}$，通过元素分析得知该细菌的分子式为 $CH_{1.7}O_{0.46}N_{0.18}$。求这个反应的得率系数 Y_C。

解　根据式（3-14），可得

$$Y_C = \frac{\sigma_X}{\sigma_S} Y_{X/S} = \frac{\frac{12}{23.58}}{\frac{72}{180}} \times \frac{85}{180} = 0.60 \ (g \cdot g^{-1})$$

3. 以 ATP 为基准的菌体得率　微生物在生长和发酵过程中，通过底物氧化获得用于细胞合成、物质代谢和能量传输等生命活动所需要的能量。但是，并不是所有由底物氧化产生的能量都能用于微生物的生命活动，只有在反应中以生成 ATP 形式获得的自由能才能够被细胞利用，而其他的能量以反应热的形式释放到环境中。微生物反应与 ATP 有密切的关系，因此，从能量的角度来看，可以把底物异化代谢中 ATP 的生成量作为菌体得率的基准，将菌体得率 Y_{ATP}定义为每生成 1mol ATP 时所增加的细胞质量，表示为

$$Y_{ATP} = \frac{\Delta m_X}{\Delta n_{ATP}} = \frac{Y_{X/S} M_S}{Y_{ATP/S}} \qquad (3\text{-}15)$$

式中，Δn_{ATP}表示 ATP 的生成量，单位为 mol；M_S 是基质的相对分子质量；$Y_{ATP/S}$是相对于基质的 ATP 生成得率，即每消耗 1mol 基质所生成 ATP 的量，单位为 $mol \cdot mol^{-1}$。

通过在复合培养基中进行厌氧发酵的实验发现，Y_{ATP} 值与微生物及底物种类几乎无关，基本上是一个常数，即 $Y_{ATP} \approx 10g \cdot mol^{-1}$。由此，式（3-15）可推算为

$$Y_{X/S} = Y_{ATP} \frac{Y_{ATP/S}}{M_S} \approx 10 \frac{Y_{ATP/S}}{M_S} \qquad (3\text{-}16)$$

根据式（3-16），如果能够计算出 1mol 底物生成 ATP 的摩尔数 $Y_{ATP/S}$，就能够求出 $Y_{X/S}$，在实际应用中可以据此来预计一定量的底物得到的菌体量。

4. 以有效电子数为基准的菌体得率　微生物反应属于氧化还原反应，可以根据底物的氧化程度来评价菌体得率，因此，在微生物反应计量中，可以用底物完全氧化失去每摩尔有效电子时的菌体生成量来表征菌体得率，称为以有效电子数为基准的菌体得率 Y_{ave^-}，表示为

$$Y_{ave^-} = \frac{\text{生成细胞的质量}}{\text{基质失去的有效电子数}} = \frac{Y_{X/S}}{Y_{ave^-/S}} \tag{3-17}$$

式中，$Y_{ave^-/S}$是底物代谢时所获得的有效电子数。在介绍生物反应还原度时曾对有效电子数进行过定义，有效电子数也可以用1mol底物完全氧化时所需氧气摩尔数的4倍来确定，例如，1mol葡萄糖完全氧化需要6mol O_2，葡萄糖的有效电子数 $Y_{ave^-/S}=6\times4=24$。

研究人员分析了79种微生物的Y_{ave^-}值，得到Y_{ave^-}的平均值为$3.07g\cdot mol^{-1}$，其中有69个样品以$C_4\sim C_6$为碳源。研究人员总结了不同微生物在不同碳源上的菌体得率，发现当底物的碳原子数更低（$C_1\sim C_3$）时，Y_{ave^-}值更低。造成这种现象的原因可能有3个：一是细胞摄取同等质量的碳源时，碳原子数含量低的碳源要消耗更多的能量（ATP）；二是碳原子数含量低的碳源分解代谢产生的ATP较少；三是用碳原子数含量低的化合物为碳源时，微生物反应需要消耗更多的能量来合成菌体中的大分子物质（如DNA、RNA和蛋白质等），Y_{ave^-}值也会降低。

3.3.2 微生物反应的代谢产物得率

微生物反应过程中代谢产物得率（metabolite yield）的计量可采用与菌体得率相同的方法，但通常以底物消耗为基准来定义，即

$$Y_{P/S} = \frac{\text{生成代谢产物的质量}}{\text{消耗基质的质量}} = \frac{\Delta m_P}{-\Delta m_S} = \frac{r_P}{r_S} \tag{3-18}$$

式中：$Y_{P/S}$是消耗1g或者1mol基质所获得的代谢产物量；Δm_P和$-\Delta m_S$分别表示代谢产物和基质的质量改变量；r_P表示代谢产物生成速率，r_S表示基质消耗速率，以$g\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}$为单位。

在以获得某种代谢产物为目的的发酵过程中，最理想的状态是底物的消耗完全用于代谢产物的合成，那么从理论上讲，微生物反应的代谢产物得率可达到最大值，该值被称为理论代谢产物得率$Y_{P/S}^{theor}$。$Y_{P/S}^{theor}$可根据微生物反应的计量关系求得。例如，酵母菌利用葡萄糖进行乙醇发酵时，如果葡萄糖全部转化成乙醇，反应平衡式可表示为

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

可得

$$Y_{P/S}^{theor} = \frac{2\times46}{180} = 0.51g\cdot g^{-1}$$

又如，谷氨酸棒杆菌利用葡萄糖和氨合成谷氨酸的代谢途径为：

$$\text{葡萄糖} + 2ADP + 2Pi \longrightarrow 2\ \text{丙酮酸} + 2ATP$$

$$\text{丙酮酸} + NAD^+ \longrightarrow \text{乙酰 CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

$$\text{丙酮酸} + CO_2 + ATP \longrightarrow \text{草酰乙酸} + ADP + Pi$$

$$\text{乙酰 CoA} + \text{草酰乙酸} + NAD^+ \longrightarrow \alpha\text{-酮戊二酸} + CO_2 + NADH + H^+$$

$$\alpha\text{-酮戊二酸} + NADPH + H^+ + NH_3 \longrightarrow \text{谷氨酸} + NADP^+ + H_2O$$

净反应可表示为

$$C_6H_{12}O_6 + NH_3 + \frac{5}{4}O_2 + ADP + Pi + NADPH + 2NAD^+$$

$$\longrightarrow C_5H_9O_4N + CO_2 + \frac{5}{2}H_2O + ATP + 2NADH + NADP^+ + H^+$$

可得：

$$Y_{P/S}^{theor}=\frac{147}{180}=0.82\ (g \cdot g^{-1})$$

通过举例可知，如果用微生物反应的计量关系来求解 $Y_{P/S}^{theor}$，就必须了解相关的代谢途径。但通常情况下，微生物反应的代谢途径是很难掌握的，这时，$Y_{P/S}^{theor}$ 可以根据碳源衡算和反应动力学参数进行计算（即 3.4.1 节中 Y_P 的定义和求解）。

对于生成抗生素、核酸、维生素、酶等少量代谢产物的发酵过程，$Y_{P/S}$ 值非常低，而且很难列出反应平衡式对该过程进行计量，因此，在这些发酵中，更为重视产物的回收率，而不太考虑计量关系。在分批培养中，若容积固定，产物的回收率就是收获时的浓度。

微生物生长和代谢过程中得率系数的大小与细胞的遗传和生理特性、碳源的性质、底物的分解代谢途径等多种因素有关。表 3-5 汇集了部分得率系数的定义：$Y_{X/S}$ 可用于比较不同底物的转化效率；Y_C 则表示底物中的碳转化为细胞中的碳的转化效率；通过 Y_{ATP} 的定义把细胞的生长效率与代谢相关联，表示了反应的能量需求；Y_{ave^-} 则把底物在微生物氧化还原反应中得到的可利用的能量与生长效率相联系。

表 3-5　部分得率系数的定义

得率系数	定　　义	单　　位
$Y_{X/S}$	消耗 1g 或者 1mol 基质所获得的菌体量	$g \cdot g^{-1}$ 或 $g \cdot mol^{-1}$
Y_{X/O_2}	消耗 1g O_2 所获得的菌体量	$g \cdot g^{-1}$
Y_C	消耗 1g 底物碳原子所获得的菌体碳原子的量	$g \cdot g^{-1}$
Y_{ATP}	消耗 1mol ATP 所获得的菌体量	$g \cdot mol^{-1}$
Y_{ave^-}	消耗 1mol 有效电子所获得的菌体量	$g \cdot mol^{-1}$
$Y_{P/S}$	消耗 1g 或者 1mol 基质所获得的代谢产物量	$g \cdot g^{-1}$ 或 $g \cdot mol^{-1}$
Y_{P/O_2}	消耗 1g O_2 所获得的代谢产物量	$g \cdot g^{-1}$

3.4　微生物反应的质量衡算

3.4.1　碳源衡算

碳源是发酵过程中消耗量最大的底物，往往在发酵成本中占有较大的份额。在微生物反应过程中，碳源的消耗（Δm_C）主要用于满足于微生物菌体生长的需要 [$(\Delta m_C)_G$]、生成代谢产物的消耗 [$(\Delta m_C)_P$] 和维持微生物生存的消耗 [$(\Delta m_C)_M$]。$(\Delta m_C)_M$ 的消耗为细胞提供了维持能，即为了维持细胞内、外化学物质梯度、细胞的运动、胞外物质向胞内的主动运输、修复受损的分子和结构等与细胞生长没有直接关系的生理活动所需要的能量。微生物反应的碳源消耗可表示为

$$\Delta m_C = (\Delta m_C)_G + (\Delta m_C)_P + (\Delta m_C)_M \tag{3-19}$$

转化为微分形式，方程两侧同除以 dt，得

$$-\frac{d\Delta m_C}{dt}=\left(-\frac{d\Delta m_C}{dt}\right)_G+\left(-\frac{d\Delta m_C}{dt}\right)_P+\left(-\frac{d\Delta m_C}{dt}\right)_M \tag{3-20}$$

若从碳源被同化为菌体的观点来定义菌体得率，可得：

$$Y_G = \frac{\text{生成细胞的质量}}{\text{用于细胞合成的碳源消耗量}} = \frac{\Delta m_X}{-(\Delta m_C)_G} \tag{3-21}$$

式中，Y_G 是以用于细胞生长所消耗碳源为基准的菌体得率，由于 $-(\Delta m_C)_G < -\Delta m_C$，故 $Y_G > Y_{X/S}$，所以将 Y_G 称为最大菌体得率或最大菌体得率系数。对于特定的微生物，Y_G 受环境变化的影响很小，基本上是一个常数，也被称为得率常数。

同样，以用于代谢产物合成所消耗碳源为基准可以定义最大产物得率系数 Y_P，可得：

$$Y_P = \frac{\text{生成代谢产物的质量}}{\text{用于代谢产物合成的碳源消耗量}} = \frac{\Delta m_P}{-(\Delta m_C)_P} \tag{3-22}$$

相对于实际得率系数 $Y_{X/S}$ 和 $Y_{P/S}$，Y_G 和 Y_P 又称为理论得率系数。

根据对理论得率系数的定义，式（3-20）可变为

$$-\frac{d\Delta m_C}{dt} = \frac{1}{Y_G}\left(\frac{d\Delta m_X}{dt}\right) + \frac{1}{Y_P}\left(\frac{d\Delta m_P}{dt}\right) + m \cdot m_X \tag{3-23}$$

两侧同除以 m_X，得：

$$q_S = \frac{1}{Y_G}\mu + \frac{1}{Y_P}q_P + m \tag{3-24}$$

式中：q_S 和 q_P 分别表示碳源的比消耗速率和代谢产物的比生产速率，即相对于生成 1g 干菌体所对应的碳源消耗速率和产物生产速率；μ 为微生物的比生长速率；m 是碳源维持常数，即 1g 微生物细胞在单位时间内维持生存所需碳源的量。

在以获得微生物细胞为目的的微生物反应过程中，代谢产物的积累可以忽略不计，式（3-24）可以简化为

$$q_S = \frac{1}{Y_G}\mu + m \tag{3-25}$$

或

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m}{\mu} \tag{3-26}$$

3.4.2 碳元素衡算

根据微生物反应质量平衡可以对参加反应的碳元素进行衡算，即：

$$\left(-\frac{d\Delta m_S}{dt}\right)\alpha_1 = \left(\frac{d\Delta m_X}{dt}\right)\alpha_2 + \left(\frac{d\Delta m_P}{dt}\right)\alpha_3 + \left(\frac{d\Delta m_{CO_2}}{dt}\right)\alpha_4 \tag{3-27}$$

式中：Δm_{CO_2} 表示 CO_2 的质量改变量；α_1、α_2、α_3 和 α_4 分别表示基质、菌体、代谢产物和 CO_2 中的碳含量。

式（3-27）的两侧同除以 m_X，得：

$$q_S\alpha_1 = \mu\alpha_2 + q_P\alpha_3 + q_{CO_2}\alpha_4 \tag{3-28}$$

式中，q_{CO_2} 表示 CO_2 的比生产速率。

3.4.3 氧衡算

微生物反应过程中的耗氧量由 3 部分组成，一部分是用于微生物维持生命活动的耗氧量，一部分为生长菌体的耗氧量，另一部分为产物耗氧量。即：

$$\Delta m_{O_2} = (\Delta m_{O_2})_G + (\Delta m_{O_2})_P + (\Delta m_{O_2})_M \tag{3-29}$$

转化为微分形式，方程两侧同除以 dt，得：

$$-\frac{\mathrm{d}\Delta m_{O_2}}{\mathrm{d}t}=\left(-\frac{\mathrm{d}\Delta m_{O_2}}{\mathrm{d}t}\right)_G+\left(-\frac{\mathrm{d}\Delta m_{O_2}}{\mathrm{d}t}\right)_P+\left(-\frac{\mathrm{d}\Delta m_{O_2}}{\mathrm{d}t}\right)_M \tag{3-30}$$

将相对于氧的细胞和产物得率常数分别定义为

$$Y_{GO}=\frac{\Delta m_X}{-(\Delta m_{O_2})_G} \quad 和 \quad Y_{PO}=\frac{\Delta m_X}{-(\Delta m_{O_2})_P}$$

式（3-30）可变为

$$-\frac{\mathrm{d}\Delta m_{O_2}}{\mathrm{d}t}=\frac{1}{Y_{GO}}\left(\frac{\mathrm{d}\Delta m_X}{\mathrm{d}t}\right)+\frac{1}{Y_{PO}}\left(\frac{\mathrm{d}\Delta m_P}{\mathrm{d}t}\right)+m_O\cdot m_X \tag{3-31}$$

两侧同除以 m_X，得

$$q_{O_2}=\frac{1}{Y_{GO}}\mu+\frac{1}{Y_{PO}}q_P+m_O \tag{3-32}$$

式中：q_{O_2}表示 O_2 的比消耗速率，即相对于生成 1g 干菌体所对应的 O_2 消耗速率；m_O 是氧维持常数，即 1g 微生物细胞在单位时间内维持生存所需 O_2 的量。

由上述质量衡算可以看出，通过微生物反应计量中的碳源衡算、碳元素衡算和氧衡算，可以将细胞生长、基质消耗和产物生成的动力学之间进行关联。通过测定微生物反应过程中微生物比生长速率、基质消耗速率、产物生成速率和 CO_2 释放速率等，也可以确定该反应的理论得率或实际得率，从而有助于反应平衡式的确立。

3.5　微生物反应的能量代谢与计量

在微生物反应中，目的产物的生成不仅取决于相关代谢路径的活性，还要遵循热力学定律。通过热力学分析，可以预测微生物的生长或者某个代谢反应是否能够自发进行、所需要的反应条件是什么，大致确定重要的反应参数，并且对微生物反应的经济性进行理论估计。热力学分析对生物反应过程优化有极为重要的意义，在实际生产或试验中，可以将热力学预测值作为参考，如果实测值与预测值的差距很大，说明该反应过程还有很大的优化空间。微生物反应是放热反应，在反应过程中，底物所含有的能量总有一部分以热量的形式释放到环境中。为了保持合适的环境温度，应根据微生物反应的放热情况在生物反应器中设置热交换器，及时移除细胞释放的反应热。研究微生物能量代谢和能源、物质利用之间的计量关系，能够为生物反应器的设计提供必需的基本信息。

3.5.1　生物能学与热力学基础

在热力学中，将一部分物体从其他部分中划分出来，作为研究对象，这部分物体称为系统，例如，生物反应器或者细胞都可被看做系统。而系统以外的部分称为环境，与系统有着直接的相互作用。根据系统和环境之间是否有物质和能量的交换，系统可分为 3 种类型：即与环境之间既有物质交换也有能量交换的“开放系统”；与环境之间只有能量交换而没有物质交换的“密闭系统”；以及与环境之间既无物质交换也无能量交换的“隔绝系统”。活的细胞能够从周围环境摄取营养物质，产生各种代谢产物并释放反应热，因此，生物体都属于开放系统。

某一热力学系统的状态是系统的物理性质和化学性质的综合表现，在热力学上用一系列

状态函数来描述系统所处的状态，如热焓和熵。状态函数的改变量只取决于系统的始态和终态，而与状态变化的过程无关。热焓（enthalpy），简称焓，用 H 表示，代表了系统的内能（U）与该系统的压力（P）、体积（V）乘积之和，即

$$H = U + PV \tag{3-33}$$

热力学第一定律指出，能的形式只能互相转变不能消灭，用数学式表示为

$$\Delta U = Q - W \tag{3-34}$$

式中：Q 表示系统吸收的热量；W 表示系统做出的功。根据式（3-33）和式（3-34）可得，对于在定压下只做体积功的反应，焓变（ΔH）等于该反应的反应热（Q），也就是说，反应过程中系统吸收或放出的热量在数值上等于系统的焓变。绝大多数生物反应的体积变化很小，可近似看成定压定容过程，此时，焓变约等于内能的变化（ΔU）。因而，在生物反应中常常忽略 ΔH 和 ΔU 的差别，而简称某一反应的能量变化。

熵用 S 表示，是代表系统有序程度的状态函数。对于可逆过程，$\Delta S = \frac{Q_{rev}}{T}$ 或 $dS = \frac{\delta Q_{rev}}{T}$；而在不可逆过程中，$\Delta S > \frac{Q}{T}$ 或 $dS > \frac{\delta Q}{T}$。其中，Q 表示系统的反应热，T 是系统的绝对温度。

细胞内发生的生物反应都遵循热力学定律。热力学第二定律表述为“一切自发过程，总的结果都是向着整体混乱度增加（熵增大）的方向进行，用数学式表示为 $\Delta S > 0$”。因此，某过程的自发性取决于总体熵的变化。在研究胞内反应是否能够自发进行时，很难用熵这个状态函数来衡量过程的自发性，这是因为熵变不易测量，它需要由环境熵变和体系熵变两个值求得。此外，反应过程的自发性也不能单单通过系统的熵变来确定。对于放热过程来说，系统放出热量时（$\Delta H_{sys} < 0$），系统的熵降低（$\Delta S_{sys} < 0$），但该过程仍然可能自发进行。这是因为，如果环境中熵的增加大于系统中熵的降低，则总体上熵是增大的，反应可自发进行。例如，变性的蛋白质可自发折叠成有序性更高的天然构象，该过程 $\Delta S_{sys} < 0$。

由于用熵变来判断反应过程的自发性存在困难，因此，在热力学上引入了一个新的状态函数来进行自发性判定，即 Gibbs 自由能 ΔG，其数学式为

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{3-35}$$

ΔH 是系统的焓变，ΔS 是系统的熵变。在定温、定压条件下，系统 Gibbs 自由能的减少等于系统所做的最大有效功。绝大多数生物反应都是在定温、定压条件下进行的，其自发性指标是 $\Delta G \leqslant 0$。自发过程，$\Delta G < 0$，是释放能量的过程，系统对环境做功；非自发过程，$\Delta G > 0$，是吸收能量的过程，必须由环境提供能量才能进行；$\Delta G = 0$ 时，系统处于平衡状态，即正向和逆向反应达到平衡。需要特别注意的是，Gibbs 自由能会随温度发生变化。可以用温度对自由能的影响来解释“在特定温度下蛋白质变性自发进行”的现象。蛋白质从变性状态折叠成天然状态，ΔH 和 ΔS 都是负值，当温度满足 ΔH 大于 $T\Delta S$ 时，折叠过程的自由能是正值，因而逆向反应（即变性过程）是自发的，即天然蛋白质的变性自发进行。

还要注意的是，一个热力学上预示可以自发进行的过程，并不意味着这个过程已经在进行，一个过程是否真正进行还要看是否存在适当的条件。即使 ΔG 是一个相当大的负值也不能说明一个化学反应能够以一定的速率自发进行。例如，对于葡萄糖被 ATP 磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖的反应，该过程自由能的变化是一个很大的负值，但是，如果没有己糖激酶的催

化，仅仅把葡萄糖和 ATP 混合在一起，该反应并不能发生。类似地，蛋白质、核酸、糖类和脂类等生物大分子的水解具有热不稳定性，但它们很少会自发水解。只有加入水解酶时，水解反应才能以一定的速率发生。作为催化剂，酶的作用是提高反应达到热平衡的速率，酶并不能改变反应的 ΔG，更不能令一个 ΔG 为负值的反应发生。

3.5.2　微生物反应热的计量

微生物反应是放热反应。在微生物生长过程中，大部分热量来源于作为碳源或能源的有机物的降解。在分解代谢中，自由能显著降低，反应释放的能量一部分储存在 ATP 或其他高能化合物的高能键中，为细胞成分的合成和其他代谢活动提供能量；另一部分以热的形式释放。当微生物利用 ATP 为细胞提供能量时，也有热量释放。微生物反应产生的热量被称为反应热（或代谢热、发酵热）。反应热的变化能够反映细胞代谢活动的特征和新陈代谢反应的进程。反应热是微生物反应的重要参数，利用反应热可以对细胞能量代谢的调节机制进行分析，计算反应过程的能量效率，还能为微生物反应传热器设计提供必需的基本信息。但实际上不常检测微生物反应热，因为测定这个参数很复杂，存在许多困难。通常使用更为方便的推算法，即根据质能平衡及相关规律，利用微生物反应过程中可测定参数对反应热进行推算。

以底物消耗和代谢产物生成为基准，可以根据各种物质的燃烧热来推算微生物反应过程的反应热。生物反应可近似看成定压定容过程，若设微生物反应中基质成分的变化量分别是 Δm_{S_1}、Δm_{S_2}、Δm_{S_3}、…、Δm_{S_m}，各种代谢产物的增加量为 Δm_{P_1}、Δm_{P_2}、Δm_{P_3}、…、Δm_{P_n}，菌体增加量为 Δm_X，则该过程的反应热可用公式表示为

$$Q = \sum_{i=1}^{m}(\Delta H_{S_i})(-\Delta m_{S_i}) - \sum_{j=1}^{n}(\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j}) - (\Delta H_X)(\Delta m_X) \tag{3-36}$$

式中：ΔH_{S_i}和 ΔH_{P_j}分别是基质 S_i 和代谢产物 S_j 的标准燃烧热（$kJ \cdot g^{-1}$）；ΔH_X 是细胞的标准燃烧热（$kJ \cdot g^{-1}$）；反应热 Q 的单位是 $kJ \cdot L^{-1}$；$-\Delta m_{S_m}$、Δm_{P_n}和 Δm_X 的单位是 $g \cdot L^{-1}$。

通常，各种物质的燃烧热可以从化工手册等相关资料中查到（表 3-6）。在没有实验数据的情况下，有机物的燃烧热可根据以下规律计算：①分子中的 C—C 键和 C—H 键，每摩尔电子产生 108.99kJ 热能；②分子中的 C ═O、CHOH 和 CH_2OH，每摩尔电子分别多产生 81.59kJ、54.39kJ 和 54.39kJ 的能量。上述计算值与实验值的相对偏差很小。微生物细胞的燃烧热一般是未知的，可以通过在含氧的弹式量热器中燃烧细胞来确定，各种微生物菌体燃烧得到的平均值 $\Delta H_X^* = -22.15 kJ \cdot g^{-1}$。如果微生物细胞组成已知，细胞燃烧热也可以用有机物燃烧热的方程进行计算，即：

$$-\Delta H_X = \frac{460.24 R_L N_C}{\text{细胞的摩尔质量}} \tag{3-37}$$

式中，R_L 表示细胞的还原水平，表示为

$$R_L = \frac{2N_C + N_H/2 - N_O}{2N_C} \tag{3-38}$$

式中，N_C、N_H 和 N_O 是细胞经验分子式中 C、H 和 O 原子数。

表 3-6　常见化合物在标准状态下的燃烧热*

化合物	燃烧热（kJ·mol⁻¹）	化合物	燃烧热（kJ·mol⁻¹）
甲烷	−890.3	丙酮酸	−1171.5
甲醇	−726.8	酒石酸	−1151
乙醇	−1366.1	马来酸	−1338.9
甘油	−1664.4	琥珀酸	−1494.1
甲醛	−561.1	富马酸	−1338.9
乙醛	−1166.5	木　糖	−2349.3
丙酮	−1825.5	半乳糖	−2806.2
甲酸	−263.2	葡萄糖	−2815.8
乙酸	−972.8	鼠李糖	−3005.4
乳酸	−1364	麦芽糖	−5649.2

* 标准状态指温度为 298K，压力为一个大气压。

3.5.3　以总有效能量为基准的菌体得率

微生物反应过程的总有效能量指生长过程中异化代谢的能量与菌体含有的能量之和。若以微生物反应过程的总有效能量为基准，可以定义菌体得率 Y_{kJ} 为

$$Y_{kJ}=\frac{\Delta m_X}{\sum_{i=1}^{m}(-\Delta H'_{S_i})(-\Delta m'_{S_i})-\sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j})+(-\Delta H_X)(\Delta m_X)} \tag{3-39}$$

式中：Y_{kJ}是生成 1kJ 总有效能量所获得的菌体得率；$\Delta H'_{S_i}$ 和 $-\Delta m'_{S_i}$ 表示参与异化代谢的底物的标准燃烧热和质量变化。Y_{kJ}的概念在微生物培养中很重要，反映了微生物反应过程对能量的利用情况。由于在微生物反应中，其他物质异化代谢产生的能量比碳源要小得多，为了简化讨论，通常认为培养基中只有一种碳源充当能源，则式（3-39）可写为

$$Y_{kJ}=\frac{\Delta m_X}{(-\Delta H'_S)(-\Delta m'_S)-\sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j})+(-\Delta H_X)(\Delta m_X)} \tag{3-40}$$

微生物好氧培养时，无论在基本培养基上还是复合培养基上，分解代谢产生的能量与反应过程所消耗的氧成正比，可以用呼吸反应的焓变来表示，即

$$(-\Delta H'_S)(-\Delta m'_S)-\sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j})=(-\Delta H_O^*)(-\Delta m_{O_2}) \tag{3-41}$$

式中：ΔH_O^* 为微生物呼吸（耗氧）反应的焓变；$-\Delta m_{O_2}$ 为 O_2 的消耗量。式（3-40）可写成

$$Y_{kJ}=\frac{\Delta m_X}{(-\Delta H_O^*)(-\Delta m_{O_2})+(-\Delta H_X)(\Delta m_X)}=\frac{Y_{X/O_2}}{(-\Delta H_O^*)+(-\Delta H_X)Y_{X/O_2}} \tag{3-42}$$

在微生物反应中，绝大多数的能量来源于碳源。微生物在复合培养基上厌氧培养时，通常培养基中有足够的合成细胞结构物质的单体，此时碳源仅作能源，则式（3-40）可变为

$$Y_{kJ}=\frac{\Delta m_X}{(-\Delta H_S)(-\Delta m_S)-\sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j})+(-\Delta H_X)(\Delta m_X)}$$

$$= \frac{Y_{X/S}}{(-\Delta H_S) - \sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})Y_{P_j/S} + (-\Delta H_X)Y_{X/S}} \tag{3-43}$$

微生物在基本培养基上厌氧培养时，碳源既作为能源，又作为构成细胞的材料。若该反应没有利用空气中的 CO_2，则有

$$(-\Delta m_{S_C}) = \frac{a_2}{a_1}\Delta m_X \tag{3-44}$$

式中：$-\Delta m_{S_C}$是转化成细胞碳的底物的量；a_1 是碳源中所含碳元素的量（$g \cdot g^{-1}$）；a_2 是菌体所含碳元素的量（$g \cdot g^{-1}$）。这样作为能源的碳源消耗为

$$(-\Delta m_S) - (-\Delta m_{S_C}) = (-\Delta m_S) - \frac{a_2}{a_1}\Delta m_X = (-\Delta m_S)\left[1 - \frac{a_2}{a_1}Y_{X/S}\right] \tag{3-45}$$

此时的菌体得率 Y_{kJ} 为：

$$Y_{kJ} = \frac{\Delta m_X}{(-\Delta H_S)(-\Delta m_S)\left[1 - \frac{a_2}{a_1}Y_{X/S}\right] - \sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})(\Delta m_{P_j}) + (-\Delta H_X)(\Delta m_X)}$$

$$= \frac{Y_{X/S}}{(-\Delta H_S)\left[1 - \frac{a_2}{a_1}Y_{X/S}\right] - \sum_{j=1}^{n}(-\Delta H_{P_j})Y_{P_j/S} + (-\Delta H_X)Y_{X/S}} \tag{3-46}$$

例 3-6　酿酒酵母在复合培养基中以葡萄糖为能源厌氧培养，反应平衡式为：

$$C_6H_{12}O_6 + 1.002O_2 + 0.284NH_3 \longrightarrow 1.670CH_{1.83}O_{0.50}N_{0.17} + 1.065C_2H_6O + 1.65H_2O + 2.196CO_2$$

已知细胞的燃烧热 $\Delta H_X = -22.93 kJ \cdot g^{-1}$，试计算 $Y_{X/S}$和 Y_{kJ}。

解　根据反应平衡式，可得：

$$Y_{X/S} = \frac{24.24 \times 1.670}{1} = 40.48 g \cdot mol^{-1}$$

由相关物理化学手册可知：

$$\Delta H_{C_6H_{12}O_6} = -2815.8 kJ \cdot mol^{-1}$$

$$\Delta H_{C_2H_6O} = -1366.1 kJ \cdot mol^{-1}$$

则：

$$(-\Delta H_P)Y_{P/S} = 1366.1 \times 1.065 = 1454.9 kJ \cdot mol^{-1}$$

根据式（3-43）：

$$Y_{kJ} = \frac{40.48}{2815.8 - 1454.9 + 22.93 \times 40.48} = 0.018 g \cdot kJ^{-1}$$

本章小结

微生物反应遵循质量和能量守恒定律，根据质能平衡可以对微生物反应过程中的质量和能量进行计量。本章重点介绍了反应平衡式、得率系数和反应热的相关计量方法。通过微生物反应计量的衡算，可以将细胞生长、基质消耗和产物生成的动力学之间进行关联。质能平衡和计量不仅对生物反应过程优化有极为重要的意义，还能够为生物反应器的设计提供必需的基本信息。质能平衡原理在化工领域被广泛地应用于评价化学反应或者生物反应过程的可行性。

参考文献

岑沛霖，关怡新，林建平．2005．生物反应工程．北京：高等教育出版社
陈洪章．2004．生物过程工程与设备．北京：化学工业出版社
贾士儒．2008．生物反应工程原理．北京：科学出版社
戚以政，汪叔雄．2007．生物反应动力学与反应器．北京：化学工业出版社
山根恒夫．2006．生物反应工程．邢新会译．北京：化学工业出版社
王建林，冯絮影，于涛，等．2008．微生物发酵过程优化控制技术进展．化工进展，27（8）：1210～1214
叶勤．2005．发酵过程原理．北京：化学工业出版社
印永嘉，奚正楷，李大珍．1997．物理化学简明教程．第三版．北京：高等教育出版社
张元兴，徐学书．2001．生物反应器工程．上海：华东理工大学出版社
Bailey J E，Ollis D F. 1986．Biochemical Engineering Fundamentals．2nd Edition. Singapore：McGraw-Hill Book Company
Gallmetzer M，Burgstaller W. 2002．Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process，adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways. Microbiology，148：1143～1149
Nagai S. 1979．Mass and energy balances for microbial growth kinetics. Advances in Biochemical Engineering，11：49～83
Nielsen J，Valladsen J，Lidén G. 2003．Bioreaction Engineering Principles．2nd Edition. New York：Kluwer Academic/Plenum Publishers
Payne W J，Wiebe W J. 1978．Growth yield and efficiency in chemosynthetic microorganisms. Annual Review of Microbiology，32：155～183

习　题

1．*Saccharomyces cerevisiae* 某菌株在葡萄糖培养基上进行厌氧发酵时，主要的代谢产物为乙醇和甘油，其微生物反应平衡方程表示为：

$$CH_2O\text{（葡萄糖）}+0.017NH_3 \longrightarrow 0.140X\text{（菌体）}+0.255C_2H_6O\text{（乙醇）}$$
$$+0.025C_3H_8O_3\text{（甘油）}+0.038H_2O+0.275CO_2$$

求该菌株的细胞分子式 X。

2．研究发现光合紫细菌由56%碳、7%氢、12%氮、16%氧、9%灰分（质量分数）组成。求具有这样一个元素组成的生物质的还原度 γ_b。

3．在啤酒酵母的生长实验中，消耗0.2kg葡萄糖，得到0.0746kg酵母细胞（分子式为 $CH_{1.66}O_{0.4}N_{0.13}$），释放0.121kg CO_2，并消耗了0.0672kg O_2，试写出反应平衡式，并求出：①菌体得率 $Y_{X/S}$；②呼吸商RQ。

4．某细菌的经验分子式为 $CH_{1.7}O_{0.46}N_{0.18}$，以葡萄糖为基质好氧培养时，菌体得率 $Y_{X/S}$ 为 $85g\cdot mol^{-1}$，Y_{X/O_2} 为 $39g\cdot mol^{-1}$，且在培养中除 CO_2 和 H_2O 外没有代谢产物生成。请解答以下问题：①列出该反应平衡式；②在分批培养时，初始条件下系统中含有0.01g菌体（CDW）和20mmol葡萄糖。过夜培养至稳定期后，系统中总的菌体量为1.0g（CDW）。求最终培养基中剩余多少葡萄糖。

5. 大肠杆菌分批培养，初期培养基中含有 $10g\cdot L^{-1}$ 葡萄糖、$2g\cdot L^{-1}NH_3$ 和 $0.1g\cdot L^{-1}$ 菌体。培养结束后培养基中剩余 $0.1g\cdot L^{-1}$ 葡萄糖，并收获干菌体 $5.1g\cdot L^{-1}$。通过元素分析可得大肠杆菌的元素组成（质量分数）为 53% C、7.3% H、12.0% N、19.0% O 和 8.7% 灰分。请解答以下问题：①分别以葡萄糖和 NH_3 为基准计算菌体得率；②写出反应平衡式；③假定所有不参与菌体生成反应的碳源都用于能量生成，且完全氧化为 CO_2，此过程中每摩尔葡萄糖生成 38mol ATP。求以 ATP 为基准的菌体得率。

6. 干酪乳杆菌在蛋白胨、牛肉膏为主要成分的复合培养基中，分别以葡萄糖和甘露醇为能源厌氧培养，结果见下表。试分别计算以葡萄糖和甘露糖为能源时，以总有效能量为基准的菌体得率 Y_{kJ}。

能源	$Y_{P/S}$（$mol\cdot mol^{-1}$）（以产物/基质计）				$Y_{X/S}$（$g\cdot mol^{-1}$）（以细胞/基质计）
	乳酸	乙酸	乙醇	甲醇	
葡萄糖	0.05	1.05	0.94	1.76	62.0
甘露醇	0.4	0.22	1.29	1.6	40.5

（$\Delta H_{葡萄糖}=-2816kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{乳酸}=-1363kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{乙酸}=-870kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{乙醇}=-1368kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{甲醇}=-264kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{甘露醇}=-3038kJ\cdot mol^{-1}$，$\Delta H_{菌体}=-22.15kJ\cdot g^{-1}$）。

7. 已知产气杆菌以葡萄糖为碳源，菌体得率 $Y_{X/S}=7.27g\cdot mol^{-1}$，求以有效电子数为基准的菌体得率 Y_{ave^-}。

8. 厌氧培养经验分子式为 $CH_{1.7}O_{0.45}N_{0.15}$ 的酵母菌，分别以葡萄糖和氨气为碳源和氮源，可能的产物包括菌体、乙醇、CO_2 和 H_2O。请解答以下问题：

（1）计算最大菌体得率（$g\cdot mol^{-1}$），并列出获得最大菌体得率时的反应平衡式；

（2）计算最大产物得率（$g\cdot mol^{-1}$），并列出获得最大产物得率时的反应平衡式。

9. 以葡萄糖为唯一碳源在基本培养基上对酵母菌进行培养，反应平衡式为：

$$C_6H_{12}O_6+3NH_3+0.48O_2 \longrightarrow 2.88CH_{1.67}O_{0.5}N_{0.17}+4.32CO_2+3.12H_2O$$

已知酵母细胞和葡萄糖的燃烧热分别为 $-1.50\times10^4kJ\cdot kg^{-1}$ 和 $-1.59\times10^4kJ\cdot kg^{-1}$。求 $Y_{X/S}$（$g\cdot g^{-1}$）和生成 1kg 细胞量时的反应热 Q。

10. 某酵母菌可以在葡萄糖或己烷上生长。某学生以 NH_3 为氮源培养酵母菌，并测定菌体得率。由于记录时粗心，记录本上仅写了以葡萄糖或己烷培养时，以碳元素消耗和氮元素消耗为基准的菌体得率 Y_C 和 Y_N 的数值，数据记录如下所示：①$0.5g\cdot g^{-1}$；②$0.8g\cdot g^{-1}$；③$11.8g\cdot g^{-1}$。对两种碳源培养来说，以 NH_3 为基准的菌体得率是一样的。请帮助该学生分清楚这 3 个数值分别是以什么为基准的菌体得率，简述分析过程。已知该菌株菌体中含有 45% 的碳和 7.0% 的氮。

第 4 章　代谢网络及其分析、设计基础

【重要概念】

代谢途径、代谢网络、代谢通量分析、代谢控制分析、通量控制系数、反应分组

引言

微生物是地球上分布最广的物种，其种属多样性和遗传多样性决定了其代谢多样性。微生物在地球物质循环中起着不可替代的关键作用，在 38 亿年的进化过程中获得了各式各样的营养吸取方式，利用其酶系可以分解利用生物质的全部组分，在一个复杂的代谢网络与调控网络中将生物质转化为生物能源（生物氢、生物乙醇、生物柴油等）、重要的化工原料（如乙烯、1,3-丙二醇等）、高分子聚合物或氨基酸、维生素、具有重要医药用途的生物活性物质等产品，微生物还能降解环境中的有毒化合物，修复被石油、排放物或辐射污染的水源和土壤，恢复生态。

但是，自然界中任何一种微生物的酶系种类有限，转化效率与能力有限，人们往往不满足于其自然代谢能力。以纤维素乙醇为例，众所周知，以可再生的木质纤维素原料（如玉米芯、秸秆以及其他农林废弃物等）发酵生产乙醇是降低对化石资源的依赖性和实现资源、能源多元化的重要举措。但是，目前发现的能够直接利用木质纤维素原料或其水解液的微生物菌株产醇能力很低，而高产乙醇菌株则不能直接利用木质纤维素原料及其水解液。因此，一种可行的办法就是通过改造微生物基因将木质纤维素利用途径与乙醇合成途径集成到一起，人工定向构建一种能够高效利用木质纤维素原料生产乙醇的工程菌株。这就需要了解相关途径所涉及的酶或基因，哪些是宿主菌已有的，哪些是需要外源引入的，分别需要上调或下调多少才能使工程菌最大限度地将原料转化为目的产物乙醇。

其他的微生物生产菌株也面临类似问题，主要包括：

（1）野生型菌株代谢速率和产物积累浓度低。由于菌体在自然进化过程中所需要和保留的代谢途径仅仅为了满足菌体生长和维持，因此不会大量积累特定代谢产物。

（2）野生型菌株产物谱广，代谢产物往往是多种产品的混合物，直接用于工业生产时，分离目的产品难度较大。

（3）自然界中微生物的进化都是自然进化，速度慢，随机性强，与工业生产目的性强的目标不符。

（4）多数微生物底物谱较窄，一般偏好一种或几种碳源，而生物质成分复杂，难以被一种菌全部利用。

因此，解析微生物的基因、蛋白质与代谢过程的本质，认识并改造微生物自然代谢能

力，提高微生物利用各种生物质的能力，并经过人为的重组和优化，重新分配微生物细胞代谢的物质流和能量流，使其更好地服务于人类社会，成为生物科学研究人员的使命，是保障经济可持续发展的战略需求。

自 20 世纪 70 年代以来，以 DNA 重组技术、淋巴细胞杂交瘤技术和细胞大规模培养技术的发明和应用为标志的现代生物技术取得了重大突破。用于 DNA 重组的分子生物学技术为代谢途径操作提供了新的方法，被生物工程领域的广大研究人员普遍使用，在氨基酸、抗生素和维生素等领域都有成功的实例，并随之发展出许多以 DNA 重组技术为基础的概念，如分子育种、细胞工程。DNA 重组技术的迅猛发展，使得对微生物的生理研究和代谢工程研究日趋深入。

细胞的定向修饰或改造首先需要确定靶标，这需要考虑很多重要的内容：如何确定决定细胞生理状态的重要参数，如何对与目的产物合成相关的主要途径进行合理修饰或改造，如何进一步评价这些定向改造的生物化学影响等，很明显，代谢网络的建立和分析是细胞定向改造的基础，并贯穿代谢工程改造的始终。

本章在重点介绍有关代谢网络及分析方法的基本概念的基础上，以乙醇为例讨论了代谢工程在微生物法生产高价值化学品方面的应用，介绍了在动物细胞培养过程中代谢通量分析的应用，探讨了代谢网络分析、调控研究的发展趋势。

4.1　代谢途径与代谢网络

在活的生物体中，细胞具有自发的生理调控功能，使能量和物质（底物、各种代谢中间物和终产物）在代谢网络中达到一定平衡。这种自发调控功能有些是与定向改造细胞的目的相一致的，但有些却使细胞的突变及基因改造策略难以实现。因此，为实现生物细胞服务于人类经济生活的目的，发现、理解代谢途径调控原理，构建出细胞代谢网络，并对其进行定性或定量的描述，打开细胞这个“黑箱”，人们才有机会了解细胞调控信息，对细胞进行合理改造或修饰。

4.1.1　代谢途径及调控原理

代谢途径及代谢调控是代谢工程研究的核心，代谢途径及代谢调控研究的最终目的就是构建更加“经济”的“细胞工厂”。代谢途径可定义为：一连串可以进行的并可观测的生物化学反应步骤，这些反应步骤以确定的一组输入和输出代谢产物相连。代谢通量定义为：输入代谢底物反应生成输出代谢产物的速率。代谢工程就是通过定量分析代谢通量及其控制的方法，发现对细胞进行改性的基因修饰举措，从而利用分子生物学方法对细胞进行系统改造，以提高目的产物的代谢能力。

对代谢通量及其控制进行系统的研究包括 3 个步骤（图 4-1）：第一步，开发能够监测尽可能多的代谢途径及其通量的方法。为实现该目的，可在测定胞外代谢产物浓度的基础上，根据简单的物质平衡原则进行推算。需要强调的是，代谢通量并不等同于途径中一种或多种酶的催化活力。一般而言，

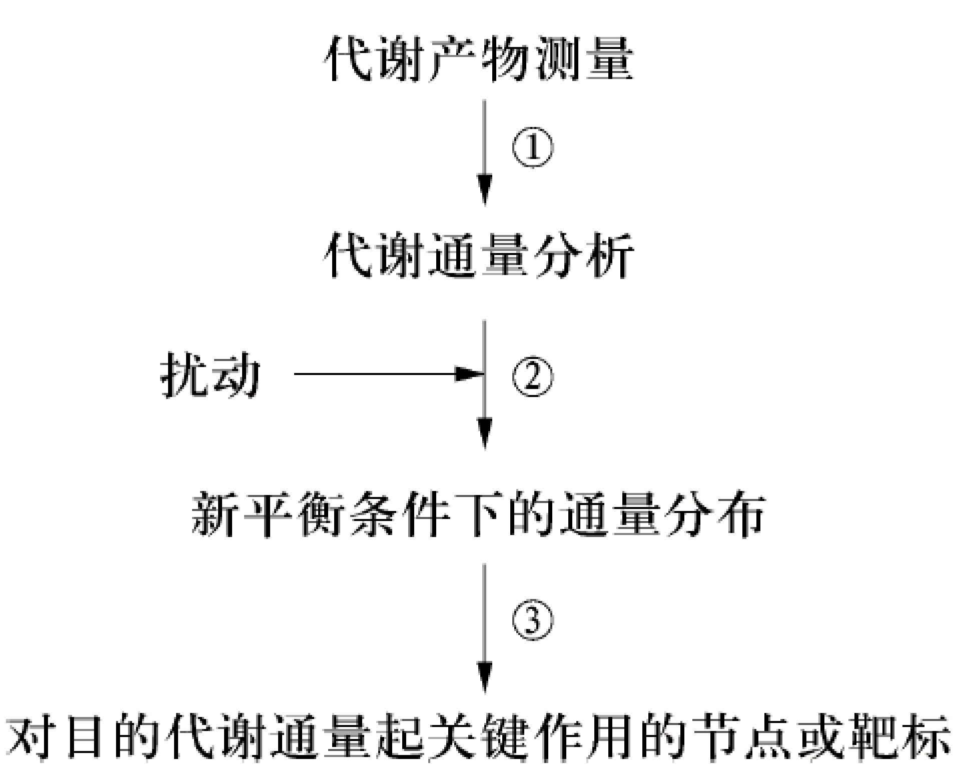


图 4-1　代谢通量及其控制分析

酶活力分析仅仅表明在胞外分析条件下相应的酶是否存在或是否具有活力，并不能提供有关途径实际通量的任何信息。第二步，向生物反应网络中引入一个精确的扰动并在系统达到新的稳态之后确定途径的通量。在恒化器中施加扰动是比较理想的体系，这种实验尤其适用于微生物或细胞培养体系。通过突然扰动其中一个分支途径的酶活力（例如通过使用诱导启动子），或施加一个底物脉冲，或切换到不同碳源，都可以获得丰富的信息。应注意的是：一种扰动能提供不止一个分支点的信息，这有利于减少用来阐明一个实际代谢网络控制结构所需的实验次数。第三步是对通量扰动实验的结果进行分析，发现对通量起关键作用的节点或靶标。

4.1.2　代谢网络的构建

最初的代谢网络构建大多建立在对特定生物系统功能理解的基础上，通过测定主要代谢产物和酶活力推测可能存在的酶催化反应，从而建立起最基本的代谢网络。因此，这一阶段所建立的代谢网络基本都是针对模式菌株的，而且为局部网络。近年来，大量基因组和注释数据的披露以及基因组学的快速发展为代谢网络的重建奠定了基础，并使代谢网络向基因组规模的全局网络构建发展。

根据基因组数据重建针对特定生物的代谢网络是对大规模代谢网络进行结构和功能分析的前提。基于某一生物的基因组注释信息并结合相关的酶反应数据库就可以确定其代谢网络中存在哪些代谢反应。随着生物信息学的迅猛发展，已经出现了基于 Web 服务的代谢途径数据库，包含与代谢网络中的酶及其在不同生物中的编码基因相关的信息，如 KEGG（http：//www. genome. jp/kegg/），这些一级数据库通过搜索工具相互链接，用这些因特网数据库可以检索某一生物中有哪些代谢反应。另外，为了快速得到一个包含特定生物代谢网络中所有已知反应的反应列表，以方便对代谢网络做进一步的数学分析，有人在 KEGG 代谢反应数据库的基础上进行修正补充后得到了新的数据库，其中包含了所有已完成测序的生物的代谢网络反应列表（目前有近 150 种生物），并可利用程序自动更新以包含新的测序生物和新的基因组注释信息。下述资源是用搜索工具链接的信息的初级数据库（表 4-1）。到目前为止，代谢模拟工具还没有把已知的代谢途径信息数据库完全整合成一个基于 Web 的中央资源。

表 4-1　目前常用的代谢途径数据库

序号	数据库名称及特点	数据库网址
1	KEGG 数据库由日本 Kyoto 大学维护，包含多个数据库：由基因组测序、功能基因组和蛋白质组实验所获得的基因和蛋白质信息（GENES/SSDB/EXPRESSION/BRITE 数据库）；由计算机处理得到的细胞内分子间相互作用的信息（PATHWAY 数据库）以及化学物质和反应信息的数据库（LIGAND 数据库）	http：//www. genome. jp/kegg/
2	WIT（已测序生物代谢途径模型）	http：//wit. mcs. anl. gov/WIT2/
3	EMP（酶和代谢途径数据库公共服务器，在 WIT 网页上有链接）	http：//emp. mcs. anl. gov/
4	UM-BBD（美国明尼苏达大学维护，微生物催化和降解数据库）	http：//umbbd. ahc. umn. edu/index. html
5	PathDB（建立和比较代谢网络的系统数据库和软件）	http：//www. ncgr. org/pathdb

4.2　代谢通量分析

在整体细胞功能和代谢过程中，代谢通量表征了代谢途径参与的程度。因此，胞内代谢通量大小的精确量化是细胞生理学和代谢工程研究的一个基本目标，尤其从生物技术产业化来看，总是希望底物尽可能转化为目的产物。代谢通量分析（metabolic flux analysis，MFA）是代谢通量确定的一个有效方法。利用主要胞内反应的化学计量模型及质量平衡原则，就可计算出胞内代谢通量。代谢通量分析是确定工业上最关心的目的产物最大得率的基础，也是确定菌株定向修饰或改造靶标的基础。

4.2.1　代谢通量分析的基本理论

代谢通量分析最基本的依据是描述底物如何转化为代谢产物和生物质的生化反应。根据动态质量平衡方程：

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{m},i}}{\mathrm{d}t} = r_{\mathrm{m},i} - \mu c_{\mathrm{m},i} \tag{4-1}$$

式中，$c_{\mathrm{m},i}$为第 i 个胞内代谢产物的浓度，$r_{\mathrm{m},i}$为该胞内代谢产物的净合成速率。$\mu c_{\mathrm{m},i}$反映细胞生长对代谢产物的稀释作用。

对包含 K 个胞内代谢产物和 J 个胞内反应的代谢网络来说，可用向量符号表征其质量守恒矩阵：

$$\frac{\mathrm{d}\boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}}}{\mathrm{d}t} = \boldsymbol{r}_{\mathrm{m}} - \mu \boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}} \tag{4-2}$$

式中，$\boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}}$是胞内代谢产物（或中间产物）的浓度向量，$\boldsymbol{r}_{\mathrm{m}}$ 是一个包含在 J 个反应中的胞内代谢产物净合成速率的向量。

绝大多数情况下，胞内代谢反应的松弛时间在 10^{-4}s 之内，远远低于细胞生长及细胞培养动力学的松弛时间（大于 100s），甚至在细胞所处环境受到强烈扰动之后，不同代谢产物库（pool）的浓度也会迅速调整到新的平衡状态。因此，可以假设胞内代谢产物处于拟稳态，即

$$0 = \frac{\mathrm{d}\boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}}}{\mathrm{d}t} = \boldsymbol{r}_{\mathrm{m}} - \mu \boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}} \tag{4-3}$$

$\mu \boldsymbol{c}_{\mathrm{X_m}}$反映由于细胞生长而对代谢产物库的稀释作用。由于大部分途径代谢产物的胞内浓度非常低，所以相比于影响同一代谢产物的其他通量，这种稀释效应的影响可以忽略。于是上式进一步简化为：

$$0 = \boldsymbol{r}_{\mathrm{m}} = \boldsymbol{G}^{\mathrm{T}} \boldsymbol{v} \tag{4-4}$$

式中：$\boldsymbol{G}^{\mathrm{T}}$ 表示根据质量守恒所得到的反应计量系数矩阵，$\boldsymbol{v}$ 表示代谢通量向量。

根据拟稳态假设，在利用 MFA 计算代谢通量时可以只考虑位于代谢网络分支点的代谢产物，而线性反应序列中的所有途径中间物都可以忽略。以糖酵解（EMP）途径中的 1, 3-二磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸为例，该转化过程包括三步反应，其化学计量式为：

1, 3-二磷酸甘油酸 + ADP ⟶ 3-磷酸甘油酸 + ATP

3-磷酸甘油酸 ⟶ 2-磷酸甘油酸

2-磷酸甘油酸 ⟶ 磷酸烯醇式丙酮酸

其中 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸分别参与两个反应，根据稳态质量平衡原则：

$$v_1 - v_2 = 0,\ v_2 - v_3 = 0 \tag{4-5}$$

式中，v_1、v_2 和 v_3 分别表示上述 3 个反应的净正反应速率①。可见，3 个反应的速率相等，因此可以把这 3 个反应合并成一个总反应：1, 3-二磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸，正反应速率为 v_1。很明显，在建立代谢途径的化学计量关系时，只需考虑在网络分支点的代谢产物，这种简化使得化学计量模型的复杂性显著降低，这对于 MFA 计算是非常有用的。

为简化线性方程组计算过程，使用向量矩阵是很常用的方式，式（4-4）向量方程式描述了包含 K 个代谢产物和 J 个生化反应（代谢通量）的代谢网络的质量守恒计量式，由 K 个线性代数式组成。

由于反应数目 J 总是大于代谢产物数目 K，该线性方程组的自由度为 $F = J - K$。因此，必须先测量向量 $\boldsymbol{v}$ 中的某些元素才能计算其余未知数。如果 $\boldsymbol{v}$ 中恰好已知 F 个通量，该系统就成为正定系统（determined system），有唯一解；如果超过 F 个通量被测量，则该系统为超定系统（overdetermined system），说明存在额外方程，可以用于总体平衡一致性检验、通量测定准确度及拟稳态假设验证等；如果已知通量少于 F，系统为不定系统（underdetermined system），此时必须引入其他约束条件或确定一个整体优化原则，才能求解未知通量。

4.2.2 正定系统的代谢通量

对于正定系统的代谢通量，利用向量矩阵的方法进行计算是很容易的。根据线性代数的方法，把已知通量合并在一个新的向量 $\boldsymbol{v}_m$ 中，未知通量合并在向量 $\boldsymbol{v}_c$ 中；对应地，把已知反应的计算系数合并到矩阵 $\boldsymbol{G}_m$，其余反应的计算系数合并到矩阵 $\boldsymbol{G}_c$。于是式（4-4）改写为：

$$0 = \boldsymbol{G}^T\boldsymbol{v} = \boldsymbol{G}_m^T\boldsymbol{v}_m + \boldsymbol{G}_c^T\boldsymbol{v}_c \tag{4-6}$$

因为已知通量恰好有 $F = J - K$ 个，因此 $\boldsymbol{G}_c$ 是一个 $K \times K$ 维矩阵，如果该矩阵可以求逆，则：

$$\boldsymbol{v}_c = -(\boldsymbol{G}_c^T)^{-1}\boldsymbol{G}_m^T\boldsymbol{v}_m \tag{4-7}$$

如果 $\boldsymbol{G}_c$ 矩阵不能求逆，即矩阵为奇异矩阵，则该系统实际上是一种不定系统。

下面通过实例来说明线性相关的代谢途径，以及如何利用矩阵方程计算较为复杂代谢网络中的通量分布。

例 4-1 线性相关的生化反应计量式。

因为大多数活体细胞能够利用多种化合物为碳源、氮源和能源，因此存在很多互补途径，这些途径在胞内有类似功能，通常仅根据胞外测量数据很难对其进行区分。进行代谢通量分析时，这些途径表现为线性相关的生化反应计量式。最常遇到的互补途径有：

（1）原核生物中的乙醛酸循环；

（2）经由谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶（GS-GOGAT）途径的氮同化作用；

（3）转氢酶系；

（4）异构酶系。

---

① 本章中，胞内反应速率 v 表示净正反应速率。该速率等同于不可逆反应的正向反应速率，或可逆反应的正向与逆向反应速率之差。

以谷氨酸脱氢酶（GDH）反应和 GS-GOGAT 系统催化的两条氮同化途径为例。这两条途径的化学计量式为：

GDH：　$-\alpha$-酮戊二酸 $- NH_3 -$ NADPH + 谷氨酸 = 0　(1)

GS-GOGAT：　$-\alpha$-酮戊二酸 $- NH_3 -$ NADPH $-$ ATP + 谷氨酸 = 0　(2)

式中，NADPH 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（还原型）。

很明显，二者的唯一差别在于 ATP 参与 GS－GOGAT 途径（尤其是高亲和力系统）而未参与 GDH 途径，两条途径是线性相关的，它们的差别不易从胞外检测的数据加以区分。因此通常在建立化学反应计量模型时两条途径被合并成一个反应。

其他互补途径也往往存在上述线性相关性，导致建立的生化反应计量矩阵奇异。如果出现矩阵奇异的情况，可以用下述方法解决：

（1）结合有关特定酶调节与诱导的信息，从模型中去除线性相关的反应；

（2）引入附加信息，如两条途径的相对通量。这可以从酶活力测定结果推出，如两条途径中关键酶的相对活力，但如前所述，体外酶活力分析仅能表明在胞外分析条件下相应的酶是否存在或是否具有活力，往往与实际的代谢通量差距甚远。比较可靠的方法是应用标记物，例如以^{13}C-葡萄糖为底物，在不同产物中进行^{13}C 标记的 NMR 测定，这种方法往往能够提供关于线性相关途径的通量分布信息。

例 4-2　用矩阵方程计算乳酸菌异型发酵的代谢通量分布。

乳酸菌通常在富含氨基酸（或酵母抽提物、蛋白胨等）的复合培养基上生长，为生物质合成提供碳骨架，因此在合成代谢途径中没有或只有极少氧化还原当量的净消耗。这导致底物（葡萄糖或乳糖）转化为初级代谢产物（如乳酸、乙酸、乙醇、甲酸和 CO_2）的同时积累一定氧化还原当量，因此乳酸菌的分解代谢途径（图 4-2）可以独立于菌体生长途径，在分析时也可以单独进行。在复合培养基上生长时，菌体合成所消耗的前体代谢产物多来源于培养基，因此乳酸菌的 EMP 途径可以简化为没有分支点的直线途径。如本章前述，从葡萄糖到丙酮酸之间的所有中间代谢产物都可以不予考虑。在某些培养条件下，一些乳酸菌仅利用葡萄糖到乳酸的代谢途径，这种发酵类型称为同型发酵，产生单一底物——乳酸。在极端饥饿条件下，细胞通过把一些丙酮酸转化为乙酸以产生更多 ATP，但这种情况导致胞内氧化还原途径不能平衡，因此细胞通过把另一部分丙酮酸转化为乙醇而再生 NAD^+［烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（氧化型）］，维持胞内氧化还原平衡。这种乳酸发酵类型称为异型发酵或混合酸发酵。

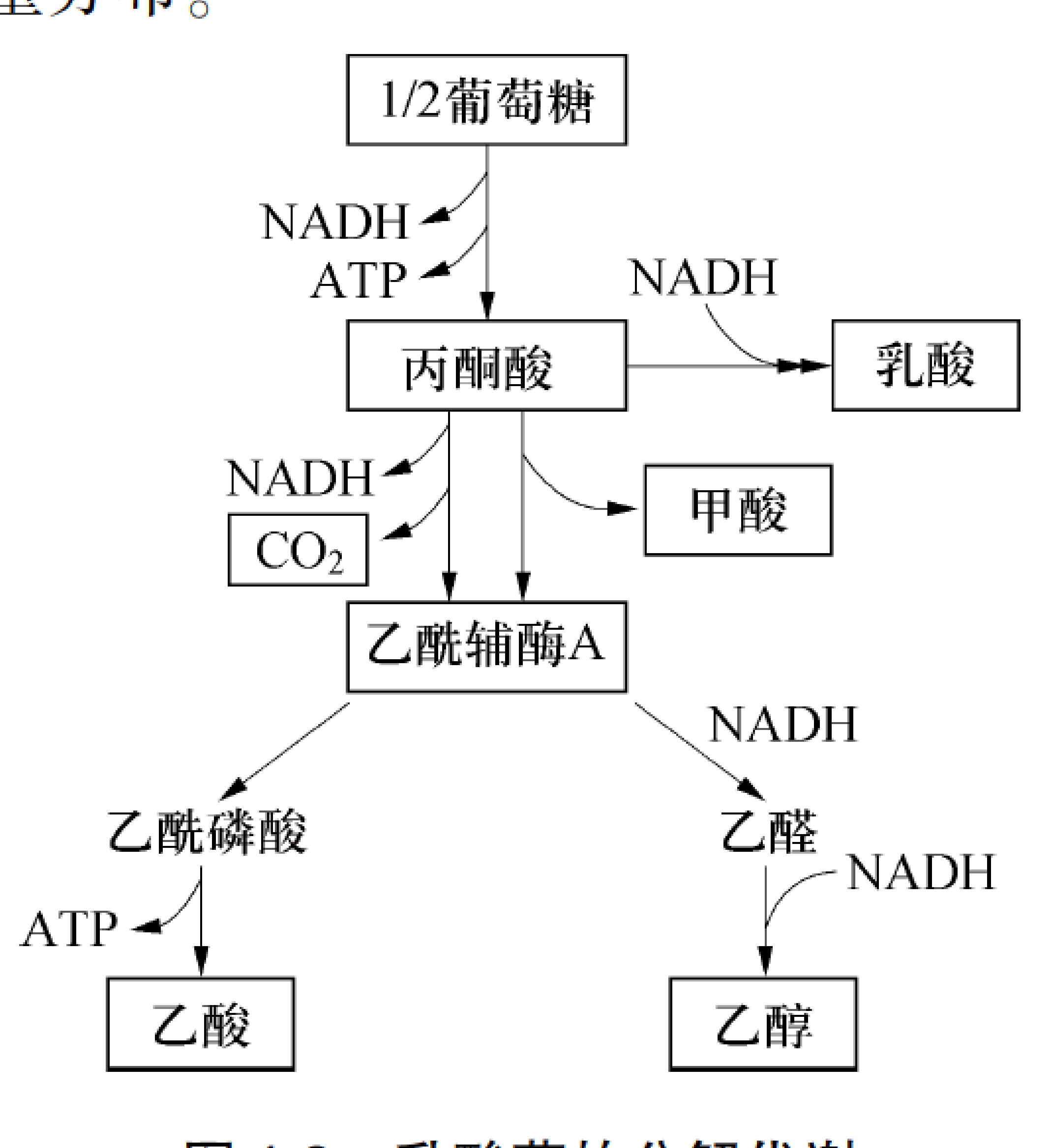


图 4-2　乳酸菌的分解代谢

丙酮酸显然是乳酸菌异型发酵的一个重要分支节点代谢产物，因此，可以围绕其建立一个质量平衡计量式；丙酮酸进一步代谢时产生 3 种中间代谢产物：乙酰辅酶 A、乙酰磷酸和乙醛，其中只有乙酰辅酶 A 位于一个分支点，可以建立一个质量平衡计量式；另外，分解代谢途径因维持自身的氧化还原平衡而产生一个 NADH［烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（还原型）］平衡或 NAD^+ 平衡（因二者的线性相关性只取其一）。虽然 ATP 的平衡也可以建立，但在仅考虑分解代谢的情况下，没有 ATP 的消耗，这个平衡是不闭合的。总之，在分析乳

酸菌异型发酵途径时，涉及3个代谢中间产物（丙酮酸、乙酰辅酶A和NADH）、1个底物（葡萄糖）和5个代谢终产物（乳酸、乙酸、乙醇、甲酸和CO_2）。

根据式（4-4），对3个代谢中间产物（丙酮酸、乙酰辅酶A和NADH）运用拟稳态假设，可以得到线性方程组：

$$\begin{bmatrix}0\\0\\0\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}1&-1&-1&-1&0&0\\0&0&1&1&-1&-1\\1&-1&1&0&0&-2\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{CO_2}\\v_{for}\\v_{ace}\\v_{eth}\end{bmatrix} \tag{1}$$

式中，下标pyr表示丙酮酸，lac表示乳酸，CO_2表示二氧化碳，for表示甲酸，ace表示乙酸，eth表示乙醇。

该方程组中3个方程式（对应于矩阵中的3行）分别表示丙酮酸、乙酰辅酶A和NADH质量平衡。如果能够先获得三个通量的数值，就可以求解其他未知通量。

假设已知葡萄糖（很明显，v_{pyr}为$2v_{glc}$）、乳酸和甲酸的通量，那么根据式（4-6）可得：

$$\begin{bmatrix}0\\0\\0\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}1&-1&-1\\0&0&1\\1&-1&0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\end{bmatrix}+\begin{bmatrix}-1&0&0\\1&-1&-1\\1&0&-2\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{CO_2}\\v_{ace}\\v_{eth}\end{bmatrix} \tag{2}$$

最后一个矩阵（$\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}$）可以求逆，于是：

$$\begin{bmatrix}v_{CO_2}\\v_{ace}\\v_{eth}\end{bmatrix}=-\begin{bmatrix}-1&0&0\\1&-1&-1\\1&0&-2\end{bmatrix}^{-1}\begin{bmatrix}1&-1&-1\\0&0&1\\1&-1&0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}1&-1&-1\\0&0&0.5\\1&-1&-0.5\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\end{bmatrix} \tag{3}$$

如前所述，如果已知葡萄糖、乳酸和甲酸的通量，由此确定其他通量并不困难（式（3））。但是如果已知的通量为葡萄糖、乙酸和甲酸，根据式（4-6），有

$$\begin{bmatrix}0\\0\\0\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}1&-1&0\\0&1&-1\\1&0&0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{for}\\v_{ace}\end{bmatrix}+\begin{bmatrix}-1&-1&0\\0&1&-1\\-1&1&-2\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{lac}\\v_{CO_2}\\v_{eth}\end{bmatrix} \tag{4}$$

最后一个矩阵不可求逆：

$$\det(\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}})=\begin{vmatrix}-1&-1&0\\0&1&-1\\-1&1&-2\end{vmatrix}=0 \tag{5}$$

很明显，由葡萄糖、乙酸和甲酸的通量不能计算出乳酸、乙醇和CO_2的通量。这是由于乙酸和甲酸通量作为已知值时，不能反映出NADH消耗的任何信息，NADH平衡式在该情况下是无效的，因此必须已知v_{lac}、v_{CO_2}或v_{eth}中的一个才能计算出其他通量。

4.2.3　超定系统的代谢通量

4.2.1节给出了超定系统的概念，这类系统中已知通量的数目超过系统自由度。因此，利用已知变量不仅能计算出未知变量，而且能验证胞内代谢产物拟稳态假设的有效性。

在超定系统中，式（4-7）中矩阵 $\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}$ 非方阵，因此不能求逆，但将方程式（4-6）左右两侧均乘以 $\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}$ 的转置矩阵 $\boldsymbol{G}_c$，可以得到：

$$0 = \boldsymbol{G}_c(\boldsymbol{G}_m^{\mathrm{T}}\boldsymbol{v}_m + \boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}\boldsymbol{v}_c) = \boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_m^{\mathrm{T}}\boldsymbol{v}_m + \boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}\boldsymbol{v}_c \tag{4-8}$$

$\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}$ 肯定是方阵，如果满秩，就可求逆。因此，v_c 可以表示为：

$$\boldsymbol{v}_c = -(\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}})^{-1}\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_m^{\mathrm{T}}\boldsymbol{v}_m \tag{4-9}$$

只要矩阵 $\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}}$ 是非奇异矩阵（可求逆），就可以利用式（4-9）对超定系统求解。实际上，式（4-9）是式（4-6）的通解。

式（4-9）本质上是向量 $\boldsymbol{v}_c$ 中未测量通量的最小二乘估计，这对于测量噪声很小而且由测量噪声所引起的约束残差被均匀分布于系统的约束（即胞内代谢产物的拟稳态平衡）中的系统是非常有效的。利用多余的平衡方程式还可以检验所测量和所计算数据的一致性。

对于噪声比较大，甚至存在较大系统误差的实验数据，需要引入一个维数等于已知通量的单位矩阵 $\boldsymbol{I}$，对已测量通量和未知通量同时进行更好的估计。

例 4-3　超定系统的通量确定。

以例 4-2 的乳酸菌异型发酵为例，如果已知 4 个通量，则系统成为超定系统。假定已知丙酮酸通量（等于 $2v_{glc}$）、乳酸通量（v_{lac}）、甲酸通量（v_{for}）以及乙醇通量（v_{eth}），则式（4-6）变为

$$\begin{bmatrix}0\\0\\0\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}1 & -1 & -1 & 0\\0 & 0 & 1 & -1\\1 & -1 & 0 & -2\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\\v_{eth}\end{bmatrix} + \begin{bmatrix}-1 & 0\\1 & -1\\1 & 0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{CO_2}\\v_{ace}\end{bmatrix} \tag{1}$$

方程式中 3 行分别为丙酮酸、乙酰辅酶 A 及 NADH 的平衡式。根据超定系统矩阵简单算法（式（4-9）），首先计算矩阵 $(\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}})^{-1}\boldsymbol{G}_c$：

$$(\boldsymbol{G}_c\boldsymbol{G}_c^{\mathrm{T}})^{-1}\boldsymbol{G}_c = \left(\begin{bmatrix}-1 & 1 & 1\\0 & -1 & 0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}-1 & 0\\1 & -1\\1 & 0\end{bmatrix}\right)^{-1}\begin{bmatrix}-1 & 1 & 1\\0 & -1 & 0\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}-0.5 & 0 & 0.5\\-0.5 & -1 & 0.5\end{bmatrix} \tag{2}$$

代入式（4-9）中，可得：

$$\begin{bmatrix}v_{CO_2}\\v_{ace}\end{bmatrix} = -\begin{bmatrix}-0.5 & 0 & 0.5\\-0.5 & -1 & 0.5\end{bmatrix}\begin{bmatrix}1 & -1 & -1 & 0\\0 & 0 & 1 & -1\\1 & -1 & 0 & -2\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\\v_{eth}\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}0 & 0 & -0.5 & 1\\0 & 0 & 0.5 & 0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}v_{pyr}\\v_{lac}\\v_{for}\\v_{eth}\end{bmatrix} \tag{3}$$

该解与例 4-2 对正定系统所求出的解是一致的（可将例 4-2 式（4）的 v_{eth} 表达式代入该例式（3）中，将求得的 v_{CO_2} 和 v_{ace} 表达式与例 4-2 进行比较）。另外，由式（3）可以看出，未知通量的计算值与丙酮酸及乳酸通量无关。

4.2.4　不定系统的代谢通量——线性规划

上文分别介绍了正定系统和超定系统的代谢通量分析方法，如果已知通量的数目小于系统的自由度，则通量方程存在无数个解。这种情况下，需要给出一个合适的目标函数（例如，细胞生长比速率最大或某产物产率最大），才能利用线性规划来确定胞内代谢通量

分布。

考虑一个含有两个变量 x 和 y 的系统，2 个变量间有如下关联：

$$2x + y = 4$$

很明显，如无其他约束条件，上式的解在如图 4-3 所示的直线 AB 上，即使将解限定在（x，y）空间的第一象限中仍有无数解。通过引入目标函数，如使目标函数 $2x+3y$ 最大化，图中虚线表示出了一组“$2x+3y$”的可能情况，很明显，该目标函数最大化的条件是两条直线相交于（0，4）点。该例中得到了一个可行解，但是在某些情况下也可能无可行解或有无数个可行解。

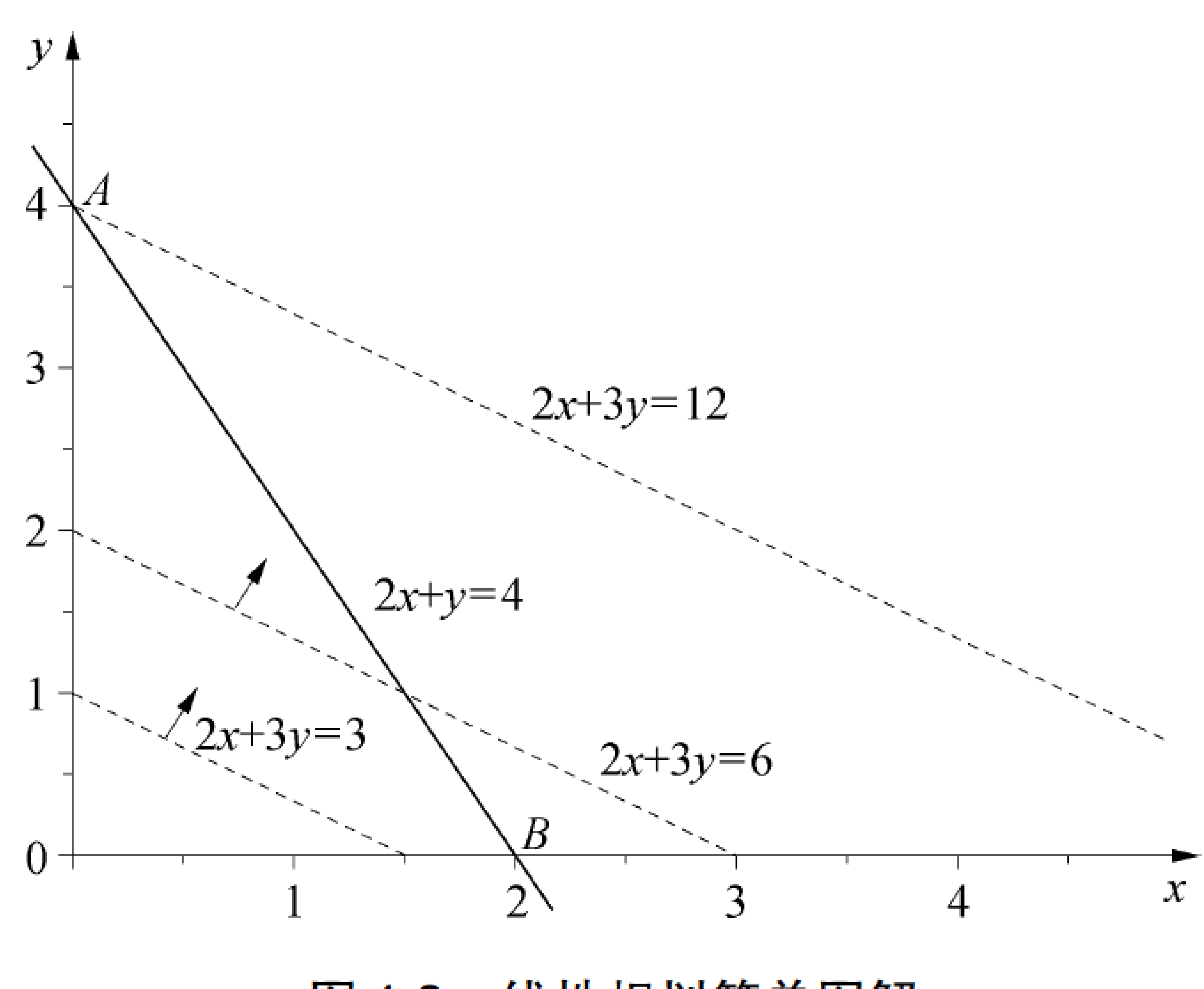


图 4-3　线性规划简单图解

由于所有代谢通量非负，因此对于代谢通量分析式（4-6）可以给出约束条件一：

$$\boldsymbol{G}_{ex}^{T}\boldsymbol{v}_{ex} = 0 \quad 且 \quad \boldsymbol{v}_{ex} \geqslant 0 \tag{4-10}$$

式中：$\boldsymbol{G}_{ex}^{T}$ 是矩阵 $\boldsymbol{G}^{T}$ 的变形，包含正向和逆向反应的化学计量式；$\boldsymbol{v}_{ex}$ 是相应的通量向量，维数为 J_{ex}。由此推论可知，每个约束条件确定了 $\boldsymbol{J}_{ex}$ 维空间的一个超平面，而由式（4-10）的约束条件确定的解必须落在这个 $\boldsymbol{J}_{ex}$ 维空间中 K（$K \leqslant J_{ex}$）个超平面的交集上。如果其中有一个超平面与其他超平面不相交，则该系统通量的可行解不存在，实际上很少会出现这种情况；多数情况下，由式（4-10）的约束条件确定的解不唯一，因此如果确定一个由这些通量线性组合而成的目标函数，通过求解相应的最小或最大化问题，就可以得到最优解：

$$\min(\boldsymbol{a}\boldsymbol{v}_{ex}) \quad 或 \quad \max(\boldsymbol{a}\boldsymbol{v}_{ex}) \tag{4-11}$$

式中，$\boldsymbol{a}$ 是包含各个通量变量权重的行向量，表示每个通量对目标函数的影响。

求解由约束条件式（4-10）和目标函数式（4-11）确定的最优解是很复杂的，因为通常对约束条件式（4-10）存在大量甚至无数可行解，每一个解都是潜在的满足所有条件的可行解。根据上述简单示例，最优解一般位于一组可行解的末端或角上。数学上的单纯形方法为解决含约束条件的线性优化问题提供了有效途径：首先，确定可行空间的一个角（或末端）；然后沿着可行解的边缘从一个角到另一个角进行计算分析。在一个给定的角，有几条边缘可供选择，一些背离最优解，另一些引向最优解，单纯形方法确保每次沿着目标函数最小（或最大）的边缘移动，导向具有更低（或更高）目标函数值的一个新角；最终，可以达到一个特定的角，这个角所有边缘都导向相关的目标函数值，因此这个角就是最优解。目前已建立了有效的算法来执行单纯形方法，或者用软件包（如 Matlab）来实现。

例 4-4　计算肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）厌氧发酵甘油生产 1, 3-丙二醇的最大理论得率，并确定定向改造靶标。

厌氧条件下 *Klebsiella pneumoniae* 甘油代谢主要有 2 条基本途径：氧化途径和还原途径，如图 4-4 所示。甘油还原途径主要有两步酶反应：①甘油脱水酶（GDHt）在辅酶 B_{12} 存在下将甘油转化为中间产物 3-羟基丙醛（3-HPA）；②在 NADH 存在下，3-HPA 在 1，3-丙二醇脱氢酶（PDDH）催化下生成 1，3-丙二醇。甘油氧化途径主要包括以下步骤：①甘油经甘油脱氢酶（GDH）催化，生成二羟基丙酮（DHA），此酶为厌氧酶，以 NAD^+ 为辅酶；②DHA 在 ATP 及二羟基丙酮激酶的作用下，生成磷酸二羟基丙酮（DHAP）；③DHAP 进一步代谢生成丙酮酸，然后进一步代谢生成乙酸、乙醇、乳酸等代谢产物。氧化途径生成生物能 ATP 和还原当量 NADH，并伴随着微生物细胞的生长。还原途径消耗氧化途径生成的过量 NADH，使微生物细胞内的氧化还原状态达到平衡。

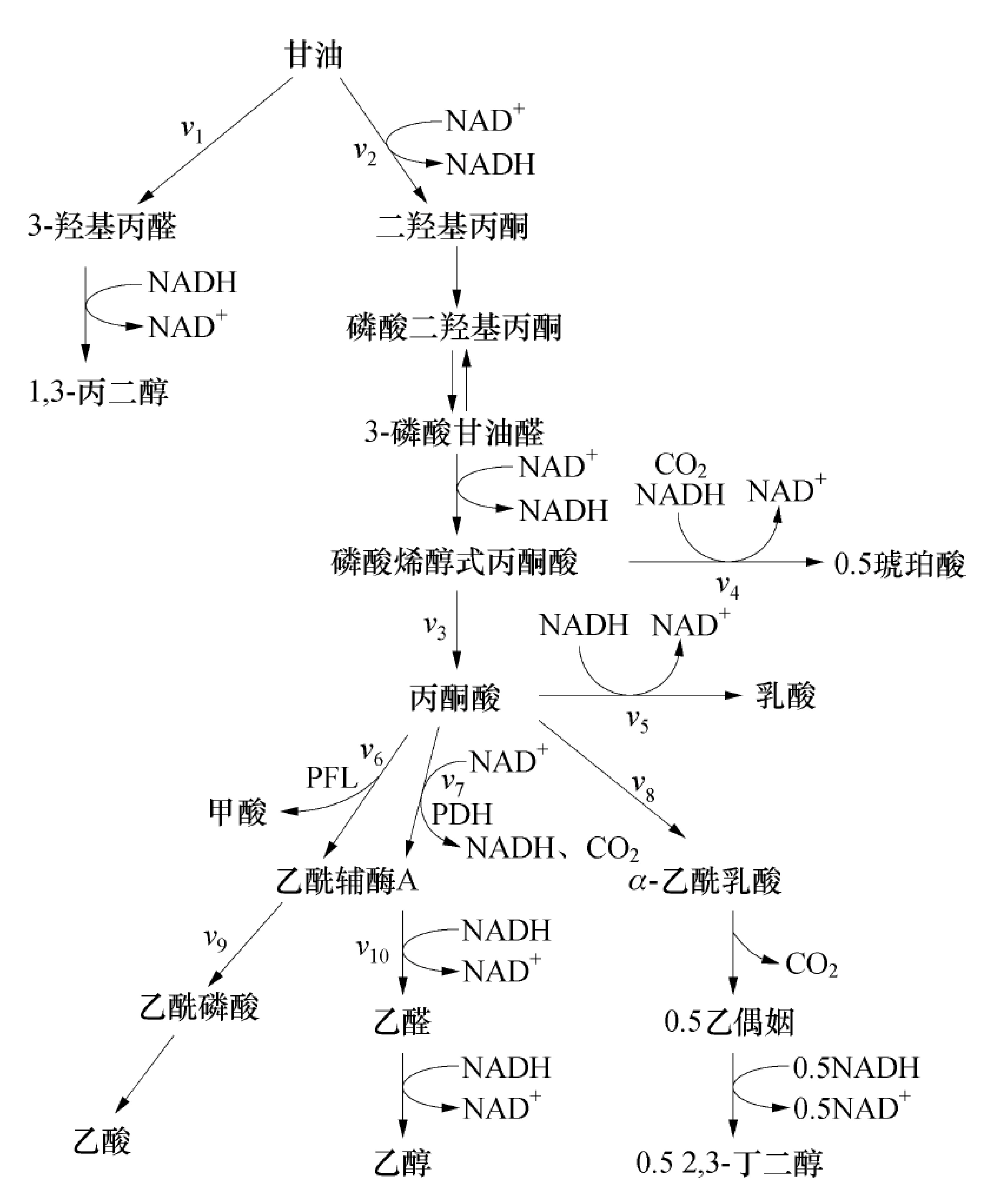


图 4-4　*Klebsiella pneumoniae* 厌氧代谢甘油主要途径

根据上文介绍，在不考虑菌体生长，并对线性相关的代谢途径进行简化后，*Klebsiella pneumoniae* 厌氧代谢甘油碳流主要涉及 4 个代谢中间产物（磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、乙酰辅酶 A 和 NADH）、1 个底物（甘油）和 8 个代谢产物（1, 3-丙二醇 PDO、乳酸、乙酸、乙醇、2, 3-丁二醇 BDO、琥珀酸、甲酸和 CO_2）。

要计算 1，3-丙二醇理论得率，首先需要计算甘油厌氧代谢各代谢通量分布，根据质量守恒定律，可以得到底物及代谢产物线性方程组：

$$\begin{bmatrix} V_{gly} \\ V_{PDO} \\ V_{suc} \\ V_{lac} \\ V_{for} \\ V_{CO_2} \\ V_{ace} \\ V_{eth} \\ V_{BDO} \\ V_{PP} \\ V_{pyr} \\ V_{CoA} \\ V_{NADH} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ -1 & 2 & 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & -0.5 & 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \end{bmatrix} \tag{1}$$

对胞内产物（磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、乙酰辅酶 A 和 NADH）进行拟稳态假设，对底物进行归一化处理，则：

$$\begin{bmatrix} -1 \\ V_{PDO} \\ V_{suc} \\ V_{lac} \\ V_{for} \\ V_{CO_2} \\ V_{ace} \\ V_{eth} \\ V_{BDO} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ -1 & 2 & 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & -0.5 & 0 & -2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \end{bmatrix} \tag{2}$$

该系统为不定系统，目标是求解 V_{PDO} 即 v_1 的最大值：

$$\max(v_1) = \max(0.5 + 0.5V_{BDO} + V_{ace} - 0.5V_{for}) \tag{3}$$

根据上述方程组：

$$v_1 = 1 - v_2 \tag{4}$$

因此式（3）还受如下约束条件限制：

$$\min(v_2) = \min(V_{lac} + 2V_{BDO} + V_{ace} + V_{eth} + 2V_{suc}) \tag{5}$$

通过数学分析，同时满足式（3）、式（5）的最优解为：

$$\max(V_{PDO}) = \max(v_1) = 0.75 \tag{6}$$

此时，$V_{ace} = 0.25$，其他代谢产物通量为零，即乙酸为唯一副产物。

因此，在不考虑菌体生长时，*Klebsiella pneumoniae* 厌氧发酵甘油生产 1, 3-丙二醇的最大理论得率为 75%，要实现该目标，需要缺失除乙酸之外的所有副产物合成途径；另外，V_{for} 也为零，表示需要将催化丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的丙酮酸 – 甲酸裂解酶（PFL）失活，而保留其同工酶丙酮酸脱氢酶（PDH）。

4.3　代谢控制分析

代谢通量分析虽然能够确定不同途径之间代谢通量的分布，但想要了解这种分布方式是如何被调控的，则需要借助代谢网络的代谢控制分析（MCA）。代谢控制分析的目的就是将代谢系统的变量（如通量）同其参数（如酶活力）联系起来，这样就可以确定代谢通量对酶活力的敏感性。

代谢控制分析可以突破传统的限速步骤的概念，使人们对代谢调控有更全面的认识。但是代谢控制分析是一个很复杂的过程，需要很多实验数据的支持，本节仅提纲挈领地介绍其中的主要概念和方法。

4.3.1　代谢控制分析的一些概念

在代谢控制分析中，一般用通量控制系数、浓度控制系数和弹性系数这 3 个参数来描述反应网络的控制规律，对于复杂的代谢网络则需要定义组控制系数。

1. 通量控制系数（flux control coefficient，FCC）　通量控制系数（$c_i^{v_k}$）是代谢途径中由任意小的酶活力变化引起的通量相对变化与该酶活力相对变化之比，即在特定稳态条件下该酶对代谢通量的影响程度，其数学表达定义为：

$$c_i^{v_k} = \frac{E_i}{v_k} \times \frac{\partial\ v_k}{\partial\ E_i} = \frac{\partial\ \ln v_k}{\partial\ \ln E_i}, \quad i,k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{4-12}$$

式中：E_i 为第 i 个酶的活力；v_k 为酶 E_i 催化下第 k 个反应的代谢通量；L 表示途径中有 L 个酶，即有 L 个反应。

通量的加和定理表述为，对于每一个通量来说，其控制系数之和必为 1，即：

$$\sum_{i=1}^{L} c_i^{v_k} = 1, \quad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{4-13}$$

从加和定理可以看出，如果一个支路代谢途径非常长，那么其中多数 FCC 的值都比较小。这也解释了为什么提高菌株的代谢产物量需要反复的连续诱变和筛选。加和定理还表明，如果改变一个酶的通量控制系数，即使其他酶的活力没有变化，其通量控制系数也会改变。

2. 浓度控制系数（concentration control coefficient，CCC）　浓度控制系数（$c_i^{c_{X_j}}$）是途径中第 i 个酶的活性相对变化引起代谢中间产物 c_{X_j} 浓度 c_{X_j} 的相对变化，即：

$$c_i^{c_{X_j}} = \frac{E_i}{c_{X_j}} \times \frac{\partial\ c_{X_j}}{\partial\ E_i} = \frac{\partial\ \ln c_{X_j}}{\partial\ \ln E_i}, \quad i \in \{1,2,\cdots,L\},\ j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4-14}$$

同样，以反应速率代替酶活力可表示为：

$$c_i^{c_{X_j}} = \frac{v_i}{c_{X_j}} \times \frac{\partial\ c_{X_j}}{\partial\ v_i} = \frac{\partial\ \ln c_{X_j}}{\partial\ \ln v_i}, \quad i \in \{1,2,\cdots,L\},\ j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4-15}$$

对于浓度控制系数同样可以使用加和定理。当所有酶活力都发生同样幅度变化时，则任

何中间代谢产物 X_j 的浓度都保持不变，因此有：

$$\sum_{i=1}^{L} c_i^{c_{X_j}} = 0, \quad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4-16}$$

3. **弹性系数（elasticity coefficient）** 弹性系数（$\varepsilon_{X_j}^i$）是在系统其他代谢产物浓度不变的前提下，由第 j 个代谢产物浓度的变化引起第 i 个反应速率的相对变化：

$$\varepsilon_{X_j}^i = \frac{c_{X_j}}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial c_{X_j}} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln c_{X_j}}, \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4-17}$$

弹性系数反映了代谢网络的局部特性，这和前两种反映代谢途径整体特性的控制系数不同。浓度弹性系数相当于特定代谢产物表观反应速率的动力学级数。

控制系数和弹性系数满足连接定理：

$$\sum_{i=1}^{n+1} c_i^{v_k} \cdot \varepsilon_{X_j}^i = 0 \tag{4-18}$$

并且

$$\sum_{i=1}^{n+1} c_i^{c_{X_k}} \varepsilon_{X_j}^i = -\delta_{jk}, \quad j,k \in \{1,2,3,\cdots,K\} \tag{4-19}$$

式中，δ_{jk} 为克罗内克（Kronecker）符号，当 $j=K$ 时，$\delta_{jk}=1$，否则为零。

从数学表达来看，上述 3 类用于代谢控制分析的参数都可以看做是独立变量变化对代谢途径影响的对数增益。如果反应的动力学方程能够确定下来，则这些参数都可以通过求偏微分得到。遗憾的是，并非所有反应过程的动力学方程都是已知的，在这种情况下就需要一些实验的测定方法。

4.3.2 代谢控制分析的基本理论

细胞对代谢途径的调控是通过调节酶、底物、代谢产物、调控因子的浓度或者活力来实现的，调控行为发生在基因转录和翻译、信号传导及蛋白质相互作用等各个水平上。通过反馈抑制或者激活可使酶迅速改变活力；在酶合成水平上诱导、分解代谢产物阻遏和反馈调节则是一种长期的调节机制。代谢调控最普遍的形式是酶活力的调节。

在一条代谢途径中，代谢通量是由代谢途径上各个反应的酶动力学调控决定的。在某些情况下，代谢通量被其中一个酶所控制，该酶则被定义为限速酶，其通量控制系数有可能接近于 1。但在多数情况下，途径的通量控制分布在几个酶中，而途径中其他反应进行得相对较快，其对应的控制系数也相对较小。以往的代谢工程研究表明，单纯超表达限速酶基因对改善代谢通量未必有明显的作用。同样，单纯消除反馈抑制作用也未必能增加代谢通量。

在一个大的代谢网络中，一般认为只有少数分支点处的通量分配比实际影响着目的产物得率。按照刚性条件分类，分支点分为 3 类：柔性节点、弱刚性节点和刚性节点。柔性节点通量分布通过底物亲和力和反应速率相近的竞争性酶来控制，其通量分布容易随着细胞代谢需求而改变，不限制产物得率。弱刚性节点通量分配由其中一个分支途径控制，这个途径上的酶具有相对高的底物亲和力或活力且没有反馈抑制。强刚性节点处的通量分布受一个或多个分支途径控制，具有反馈控制的特点。代谢工程研究很重要的一个方向就是通过改变分支点的通量分布来达到提高产物得率的目的。

4.3.3 通量控制系数的确定

通量控制系数是反映通量控制的一个重要度量标准，其确定方法可分为以下 4 种。

1. 直接法　根据通量控制系数的定义（式（4-12）），通过对酶活力进行微小扰动直接测量得到一组酶活力和通量的对应关系曲线，然后计算这条曲线的斜率，从而得到通量控制系数。

2. 间接法　根据控制系数和弹性系数的连接定理（式（4-18）、式（4-19）），通过测量弹性系数来计算通量控制系数。根据弹性系数的定义，其数值可以通过测量不同环境操作条件下代谢产物浓度与通量之间的相对变化来确定。

3. 通过瞬变代谢产物的测量　假定酶反应动力学是线性的，则可以根据下式通过测量瞬变期间代谢产物浓度来估算通量控制系数：

$$\sum_{i=1}^{L} c_i^v \frac{v_i(t)}{v_i} = 0 \tag{4-20}$$

式中：$v_i(t)$ 是通过第 i 个酶催化反应的瞬时通量；v_i 是第 i 个酶所催化反应的稳态通量；v 为所考查的分支途径的稳态通量。

4. 根据动力学模型直接计算　代谢途径的动力学模型建立之后，可以通过直接测量大范围的酶活力扰动所产生的酶活力和通量来计算控制系数。线性代谢通量控制系数等同于偏差指数，其具体计算公式为：

$$D_i^v \equiv \frac{\Delta v}{\Delta E} \times \frac{E_i^r}{v^r} = c_i^v \tag{4-21}$$

式中：D_i^v 为偏差指数；E_i^r 表示扰动后的第 i 个酶的稳态酶活力，其与初始稳态酶活力 E_i^0 的关系为 $E_i^r = rE_i^0$；v^r 为扰动后的通量。

对于分支途径，偏差指数与通量控制系数之间的关系为

$$D_i^{v_k} \equiv c_i^{v_k} F_i^k \tag{4-22}$$

其中

$$F_i^k = \frac{1}{1 - (c_i^{v_i} - c_i^{v_k})\frac{r_i - 1}{r_i}} \tag{4-23}$$

式中：i、k 分别代表第 i 个酶和第 k 个反应；r_i 表示酶 E_i 活力提高了 r_i 倍。

4.4　代谢网络结构分析

4.4.1　代谢网络的结构分析简介

前文论述了代谢控制分析（MCA）的基本概念及其关键参数的确定方法。很明显，MCA 以控制系数的形式提供了由代谢网络中每个反应步骤对代谢通量和代谢产物所施加的控制程度。

本节将在前文的基础上，介绍对更加复杂的代谢网络通量控制进行分析的方法。一个复杂的代谢网络可以定义为：一个含有许多酶反应的系统，这些反应产生和消耗代谢产物，并通过共同的前体物、产物或效应物相互影响。该网络通过一系列反应对底物进行转化，最终产生一种或多种目的产物，同时竞争性产生一些副产物。

由于存在分支是复杂系统所共有的最简单的特征，每一个分支点的存在都增加了网络的复杂性，因此有两点需要明确：①确定整个网络通量控制中的重要分支点；②理解在分支点处的通量控制分布并提供测量这种控制的综合方法。

对于大的生物合成网络来说，为降低分析难度，需要首先将反应分组，然后研究每一个

反应组对整个代谢通量控制的影响。虽然总体思路很简单，但实际执行步骤可能非常复杂，本节先简要介绍这种系统研究的原则和关键步骤：

（1）第一步是建立对反应和途径进行分组的原则。这对简单的反应系统是清晰明了的，但随着网络的大小和复杂性的增加，就变得不那么清楚了。下文几个小节将提供系统地对反应进行分组和识别网络中关键分支点的方法。

（2）组通量控制系数（gFCC）提供了一组反应对代谢途径通量影响的一种度量标准。gFCC 的确定将在后文介绍，利用该值可以进行以下工作：第一，通过比较不同 gFCC 的大小有可能确定单个的通量控制系数，从而准确找出对目的通量影响强烈的反应；第二，通过连续的分组和分析，gFCC 允许通量控制被局限在较少的反应中。

（3）根据自上而下 MCA 和反应分组分析，可对目的通量进行优化。在优化过程中，很显然不可能对生物合成网络中所有反应的速率进行任意增大，存在着中间代谢产物浓度允许变化范围的限制。由于代谢产物水平的过度变化会影响网络的稳定性，因此希望把它们维持在正常的稳态值附近。这意味着需要在希望通量大幅增加与所允许的有限的代谢产物浓度变化这一约束条件间实现平衡，从而得到最优的通量增加。

（4）最后需要考虑试验误差对结果的影响。为此，要通过内部一致性检验以确保所得到的结果没有违反这些关键性假设。

4.4.2　单一分支点处通量分布的控制

本着由简单到复杂的原则，在讨论复杂体系的性质之前，要先深入了解单一分支点的功能作用。对分支点来说，有几个概念是非常重要的，包括分支点通量分布的柔性、分支途径中通量控制的分布以及由中间代谢产物浓度的极端水平导致代谢不稳定的可能性。

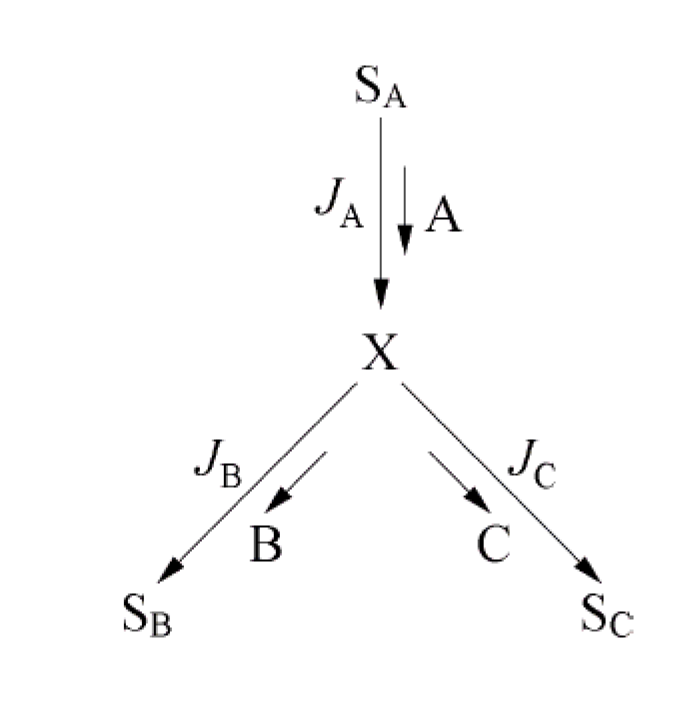


图 4-5　简单分支点示意图

为区别于反应速率，该处反应 A、B、C 所代表的代谢途径通量分别用 J_A、J_B、J_C 表示

本节将通过动力学分析解释这些问题。如图 4-5 所示的简单分支点包括 3 个反应：A、B 和 C。由反应 A 产生的中间代谢产物 X 可被反应 B 和 C 所利用。在稳态条件下，反应 A 的通量严格等于反应 B 和 C 的通量之和。

假定这 3 个反应都符合标准的米氏（Michaelis-Menten）动力学方程，对于每一个将底物 S 转化为产物 P 的反应，其反应速率可表示为

$$v = v_{max} \frac{c_S - \dfrac{c_P}{K_{SP}}}{K_{m,S} + c_S + c_P\left(\dfrac{K_{m,S}}{K_{m,P}}\right)} \tag{4-24}$$

式中，c_S 为反应物浓度，c_P 为产物浓度，其余参数为特定反应的动力学常数（非负）。对图 4-5 表示的分支点，其柔性和通量在两条相互竞争的分支途径中的分布由 3 个反应动力学曲线共同控制。因此必须考虑其他代谢产物浓度和参数都固定不变时，分支点代谢产物 X 的浓度变化对速率的影响。此时，上游反应 A 的动力学方程可表示为

$$v_A = v_{max,eff_A}\left[\frac{1 - k_{1A}c_X}{1 + k_{2A}c_X}\right] \tag{4-25}$$

而每一个下游反应的动力学表示为

$$v_i = v_{\max,\mathrm{eff}_i}\left[\frac{c_X - k_{1i}}{c_X + k_{2i}}\right], \quad i \in \{B, C\} \tag{4-26}$$

式中，某一特定反应的 3 个参数 k_1、k_2 和 $v_{\max,\mathrm{eff}}$ 均是所特有的动力学参数和 A、B、C 浓度的一个复合式，应该注意的是这些数值在上述 3 个反应速率方程式中是不同的。此外，每一个参数均非负。若所有上述参数均不为零，则式（4-25）和式（4-26）具有双曲线形式，如图 4-6所示。若 k_1 和（或）k_2 为零，这些曲线将具有不同的形式（图 4-6）。

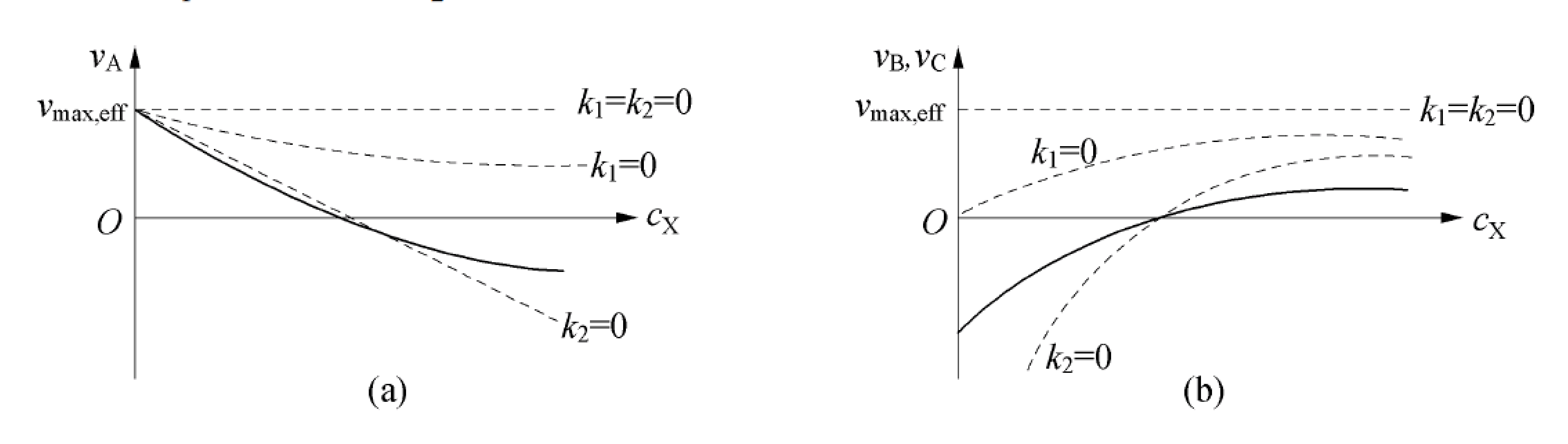


图 4-6　反应速率和中间代谢产物浓度的关系

（a）上游途径 A 的速率；（b）下游分支途径的速率

图中曲线根据式（4-25）和式（4-26）画出，虚线代表特定参数值为零的情况

对每一个分支点，下游分支途径之间都存在竞争。为了能够将这些概念扩展到复杂网络的控制中，正确理解发生在分支点的稳态操作情况下的竞争及分支点控制分布的复杂性是非常重要的。

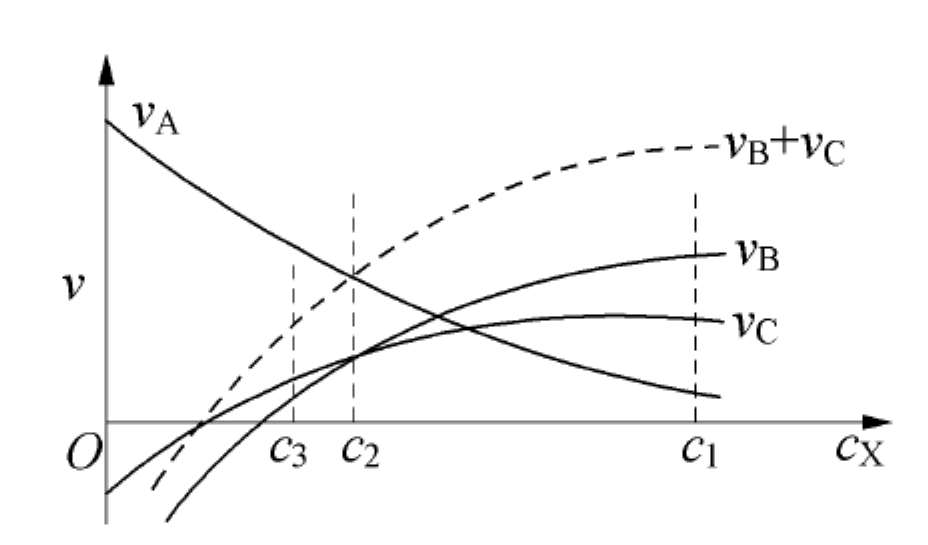


图 4-7　围绕分支点的 3 个反应速率

中间代谢产物的稳态浓度在曲线 v_A 和曲线 v_B+v_C 的交点，即图中 c_2 处；

一个分支点的刚性取决于稳态浓度时每条速率曲线的斜率

分支点的重要特点是它的通量分布，即下游分支反应的通量比。一般来说，通量的分布强烈依赖于分支点代谢产物的浓度。例如，图 4-7 所示的典型分支点反应曲线，如果 X 的浓度非常高（c_1），则两个分支反应都将处于各自的最大有效反应速率，而 c_X 的扰动对它们的反应速率几乎没有影响，即每个反应对 c_X 的弹性几乎为零。这意味着分支途径 B 和 C 之间的通量分布是固定的，这时的分支点定义为刚性分支点。另一种产生刚性分支点的情况是 c_X 的变化导致 B 和 C 的速率几乎按相同比例变化，通量分布仍保持不变，也就是说，每个反应对 X 增量的竞争大致是相等的，并导致相近的通量比。另一方面，如果 X 的浓度为 c_2，c_X 的一个小变化将导致 B 反应的速率变化比 C 反应的速率变化大得多，该条件下两个反应相对于 c_X 的弹性是不同的，此时的分支点定义为柔性分支点。实际上，反应 B 比反应 C 对新增加的 X 更具竞争性。

值得注意的是，由于稳态条件下 B 和 C 的反应速率之和等于 A 的反应速率，因此分支

点中间代谢产物的稳态浓度实际上依赖于3个反应的动力学变化。相应地，如果反应A的有效速率被诱导改变（如改变S_A的浓度或增大酶A的活力），c_X将达到一个新的稳态水平，导致3个分支途径中的通量均发生变化。分支点的刚性或柔性对通量分布的变化趋势提供了定性的解释。此外，利用下游反应相对于分支点代谢产物水平的弹性比可以量化通量分布的变化。

图4-7中的速率曲线也为理解围绕分支点的通量控制提供了帮助。例如，考虑分支A的速率变化，它会通过X的稳态浓度的变化传递到其他分支途径。对于一个刚性节点，每一分支途径的通量将大致按照同一比例变化。对这样一种变化来说，它对3个反应的通量控制系数是大致相等的，而且，如果反应B和C的速率都接近其最大有效反应速率，对于3个反应来说，分支A中的任何变化的通量控制系数将接近零，但是浓度控制系数c_A^{cX}可能具有非常大的正值。而假设是柔性分支点，反应A的变化将导致下游的一个分支代谢通量变化比另一途径大得多，对图4-7中显示的c_2处，反应A活力的很小下降将导致X的稳态浓度下降，结果反应B的通量比反应C的通量下降大得多，这种情况下，浓度控制系数c_A^{cX}值要比刚性分支点的情况小得多。

下游分支点所施加的控制也可以从图4-7中看出：如果在初始稳态浓度c_1时反应B的活力增加，则反应B的速率曲线将向上变化，由于此时反应C的速率已经接近最大有效反应速率，因此X稳态浓度的下降不会引起反应C通量的明显变化，但是，反应A和反应B的通量将几乎同样增加；因此，这样一种变化对反应C的通量控制系数$c_B^{J_C}$将具有一个很小的负值，而$c_B^{J_B}$和$c_B^{J_A}$将具有很大的正值，浓度控制系数c_B^{cX}也将具有相当大的负值。如果分支点是柔性的（图4-7中c_2处的情况），反应B活性增加将会增大反应B的通量，同时伴随X的浓度下降和反应C通量的大幅下降，其反应A的通量会适量增加；实际上，这种情况主要引起的是通量由反应C转向反应B，因此$c_B^{J_C}$将具有一个很大的负值，$c_B^{J_B}$具有一个大的正值，$c_B^{J_A}$具有一个小的正值，同时，由于X的浓度在一个柔性分支点比在刚性分支点变化得更少，浓度控制系数c_B^{cX}也将具有小的负值。

虽然不同分支点的速率曲线可能具有不同形式，但这些典型分支点分析为理解更复杂的网络奠定了基础。在一个具有多个分支点的复杂网络中，这些分支点之间可能存在一定数量的反馈作用，这种情况下网络中特定部分的活性变化影响难以通过图形说明，但可以用数学方法进行分析。

需要说明的是，对一个分支点，可能存在某种边界条件，限制着可允许的活性变化。尤其是，在刚性分支点中，上游分支途径的活性增加可能导致中间代谢产物浓度陡然增加，而下游分支途径的通量未发生显著变化，如图4-7中c_1处的情况。另外，如果曲线v_A与v_B+v_C根本不相交，中间代谢产物的浓度将达不到稳态值，这意味着代谢不稳定，此情况下实际代谢产物浓度可能下降为零，也可能达到毒性水平，或者诱导出其他代谢途径。这是在实际应用中应该避免的不稳定性情况。

4.4.3 反应分组

如前所述，代谢控制分析传统上由所涉及的各个反应对网络通量的影响所确定，因此确定控制系数的常用方法都基于单个酶扰动的动力学，及这种动力学扰动对通量的影响。这种自下而上的方法在研究简单途径或少量步骤代谢控制的网络研究中是非常有用的。但是，对于复杂途径，要针对每一个酶进行分析太困难。解决的办法是将反应分组，考查各个反应组

对代谢通量的影响，为此产生了组通量控制系数 gFCC 的概念，定义为把整个反应组作为一步反应时其通量控制系数，其主要原则是将研究重点放在反应组而不是单个反应上，随着对不同反应组的评估，最后汇聚到对整个网络的动力学控制起主要作用的单个反应或反应组上。

1. 组通量控制系数　一个组通量控制系数定义为，当把整个反应组作为一个单个反应步骤时的通量控制系数。图 4-8（a）所示的无分支反应组 A 就是一个反应组的简单示例。如果反应组 A 内的每一步反应的活性按照相同的比例被改变，则反应组 A 对本身通量 $^*c_A^{J_A}$ 的 gFCC 定义为：代谢通量所产生的相对变化 $\left(\dfrac{dJ_A}{J_A}\right)$ 与反应组中每一步反应活性相对变化 $\left(\text{即整个组的活性变化，}\dfrac{d^*v_A}{^*v_A}\right)$ 的比值：

$$^*c_A^{J_A}=\frac{dJ_A}{d^*v_A}\times\frac{^*v_A}{J_A} \tag{4-27}$$

式中通量和反应速率的上标 * 表示这些量对应于反应组而不是单个反应。

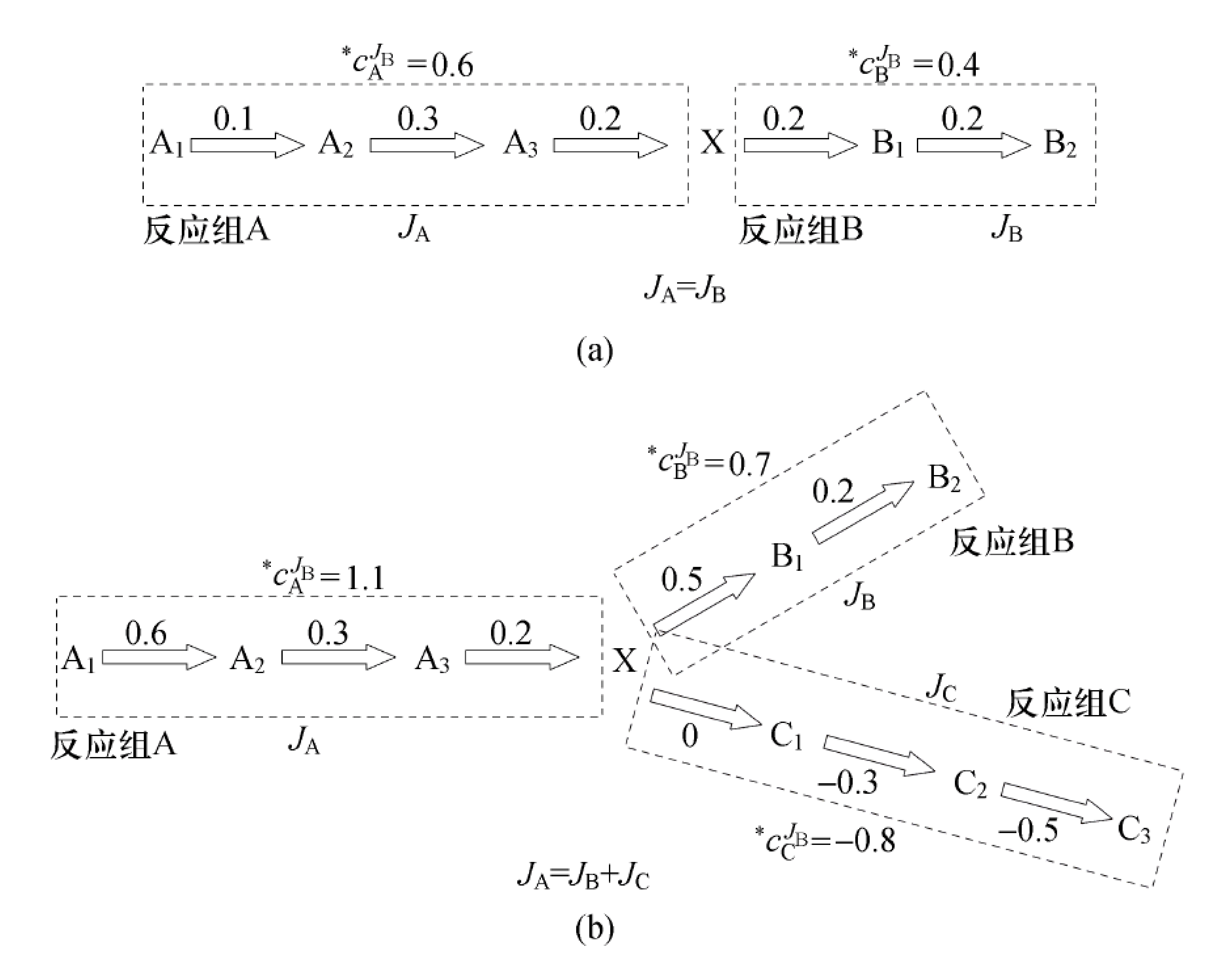


图 4-8　围绕连接代谢产物 X 的反应进行典型分组示意图

（a）非分支途径；（b）分支途径

图中也标出了各组之间的通量平衡，以及各单个反应和反应组对反应组 B 的通量控制系数

由于实际上不可能使一个反应组中的所有反应发生同样幅度的扰动，因此必须在反应组中实际扰动发生后通过测量通量和通量变化来确定 gFCC。需要强调的是，反应分组是用一个总反应替代了所涉及的所有单个反应，根据通量控制分析的加和定理，总反应的 gFCC 等于反应组中所有单个反应的通量控制系数之和。

对如图 4-8（b）中所示的分支代谢途径，其关键是，对每一个分支反应，需要确定其中一个分支途径的变化对流经所有分支代谢通量的影响。因此，对于每一个代谢网络中的分支途径都有 3 个 gFCC，这样总共有 9 个 gFCC。在更复杂的代谢网络中，可以围绕几种不同的代谢产物识别反应组，如此，分别确定围绕每一个连接代谢产物的反应组的 gFCC 后，依

据不同重叠组的 gFCC 数据就可以确定重叠反应组之间所共有的 gFCC 数值了。

2. 组通量控制系数的确定 在分支网络中，要确定组控制系数，需要知道连接反应组的代谢产物浓度及其进入每个反应组的通量。这些测量既包括基准的稳态条件下的测量，也包括系统受到扰动后的新稳态的测量。这里所说的扰动必须被限制在单个反应组内，包括酶调控引起的活性变化、酶基因拷贝数扩增或者外部转运增强等。

对于一个简单的分支点（图 4-8（b）），其稳定状态可以用连接代谢产物 X 的浓度和 3 个组通量 J_A、J_B、J_C 表示。为了确定这个分支点的组通量控制系数，需要测量基态和分别对 3 个支路进行扰动状态下的组通量，以 $J_{k,0}$ 表示基态下通过组 k 的通量，以 $J_{k,A}$、$J_{k,B}$、$J_{k,C}$ 分别表示源于组 A、B、C 的扰动所带来的通过组 k 的通量。

每一个扰动态都可以用扰动常数 K_i 来表示：

$$K_i = \frac{{}^*c_i^{J_A}}{f_i^A - 1} = \frac{{}^*c_i^{J_B}}{f_i^B - 1} = \frac{{}^*c_i^{J_C}}{f_i^C - 1}, \quad i \in \{A, B, C\} \tag{4-28}$$

式中，f_i^k 为通量扩增因子，定义为扰动后的稳态通量与基态通量之比。

$$f_i^k = \frac{J_{k,i}}{J_{k,0}}, \quad k \in \{A, B, C\} \tag{4-29}$$

很明显，通量扩增因子可通过试验测量，如果每个扰动的扰动常数都已知，那么就可以根据式（4-28）确定组通量控制系数 gFCC：

$${}^*c_i^{J_k} = K_i(f_i^k - 1) \tag{4-30}$$

3. 扰动常数 K_i 的确定

根据加和定理：

$${}^*c_A^{J_k} + {}^*c_B^{J_k} + {}^*c_C^{J_k} = 1, \quad k \in \{A, B, C\} \tag{4-31}$$

即：

$$K_A(f_A^k - 1) + K_B(f_B^k - 1) + K_C(f_C^k - 1) = 1, \quad k \in \{A, B, C\} \tag{4-32}$$

定义：$p_i^k = (f_i^k - 1) = \dfrac{J_{k,i} - J_{k,0}}{J_{k,0}} (i, k \in \{A, B, C\})$，则可以得到下面加和方程组：

$$\begin{cases} K_A p_A^A + K_B p_B^A + K_C p_C^A = 1 \\ K_A p_A^B + K_B p_B^B + K_C p_C^B = 1 \\ K_A p_A^C + K_B p_B^C + K_C p_C^C = 1 \end{cases} \tag{4-33}$$

以矩阵形式表达为

$$\begin{pmatrix} p_A^A & p_B^A & p_C^A \\ p_A^B & p_B^B & p_C^B \\ p_A^C & p_B^C & p_C^C \end{pmatrix} \begin{pmatrix} K_A \\ K_B \\ K_C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix} \tag{4-34}$$

根据分支点的物质守恒，式（4-34）是一个奇异方程，需要一个补充方程才能求解扰动常数。根据分支原理

$$\frac{{}^*c_C^{J_A}}{{}^*c_B^{J_A}} = \frac{J_{C,0}}{J_{B,0}} \tag{4-35}$$

将扰动常数和通量扩增因子代入并进一步整理得到：

$$\frac{K_C}{K_B} = \frac{J_{C,0} p_B^A}{J_{B,0} p_C^A} = q \tag{4-36}$$

联立方程式（4-34）和式（4-36）就可求得扰动常数，代入式（4-30）就可以得到 9 个

组控制系数。

如果反应组的总活性变化是已知的，也可以通过活性扩增因子 r_i 来表示反应组 i 内的扰动：

$$r_i = \frac{\overset{*}{v}_{i,i}}{\overset{*}{v}_{i,0}}$$

$$K_i = \frac{r_i}{f_i^i(r_i - 1)}, \quad i \in \{A,B,C\} \tag{4-37}$$

一旦确定了组通量控制系数，连接代谢产物组浓度控制系数（gCCC）就可以确定了，只要再测出连接代谢产物在基态（$c_{j,0}$）和扰动态（$c_{j,i}$）下的浓度，就可以根据下式求出 gCCC：

$$\overset{*}{c}_i^{X_j} = K_i\left(\frac{c_{j,i}}{c_{j,0}} - 1\right), \quad i \in \{A,B,C\}, \quad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4-38}$$

4.5　代谢途径优化

前面几节对代谢通量分析和代谢控制分析原理和方法进行了简要介绍，作为代谢工程的最终目的还是通过代谢分析找到途径中的改进靶点。本节将讨论如何通过代谢分析的方法确定以目的产物提高为目的的代谢途径改进方向。本节将以代谢途径每一步反应的动力学为基础，求解 4.4 节提到的一些代谢控制参数。

4.5.1　酶反应动力学

关于酶反应动力学的详细内容可参考本书前面章节的论述，本节以在生物化学领域应用最广的米氏（Michaelis-Menten）酶反应动力学为例，介绍代谢途径优化研究的方法。

需要说明的是，酶反应动力学构建的模型中存在着大量的非线性方程或函数，使得其在数学上并不易处理，尤其是在有时间限制（例如根据代谢模型进行发酵过程在线控制）的条件下，可能会带来错误的结果。对于非线性函数的优化问题，远没有线性函数的优化问题容易处理，尽管一些仿生的进化算法已经被用来解决这类问题。

接下来将介绍一种近似的线性化方法，以处理复杂代谢网络的非线性问题，并实现代谢途径优化的目的。

4.5.2　幂函数近似法

对于米氏函数，可以在任意稳态操作点找到一个幂函数表达式，使之与米氏函数在一定范围内近似：

$$v = aX^g \tag{4-39}$$

式中，a 为速率常数，g 为动力学级数，X 对应于底物浓度 c_X。幂函数式（4-39）的优点在于其可以通过对等式两边直接取对数进行线性化：

$$\ln v = \ln a + g\ln X \tag{4-40}$$

根据上式可直接求得动力学级数 g，并根据 g 求得速率常数 a：

$$g = \frac{dv}{dX} \cdot \frac{X}{v} = \frac{d\ln v}{d\ln X} \tag{4-41}$$

$$a = v_0 \cdot X_0^{-g} \tag{4-42}$$

式中，v_0 为 X_0 点处的酶反应速率。

动力学级数和速率常数的数值会随着操作点选择的不同而变化，但是近似方程的结构总是不变的，这意味着即使不知道基本过程的确切结构也可以建立近似方程。

通过这种方式，在计算多变量速率 $V(X_1, X_2, X_3, X_4, \cdots, X_n)$ 的幂函数近似值时，可以选择一个含有 n 维的操作点 $P(p_1, p_2, p_3, p_4, \cdots, p_n)$，在 $n+1$ 次对数空间中通过线性变化得到如下的幂函数形式：

$$V = aX_1^{g_1}X_2^{g_2}X_3^{g_3}X_4^{g_4}\cdots X_n^{g_n} \tag{4-43}$$

每一个动力学级数 g_i 可以直接通过在操作点 P 处的 V 对 X_i 求偏微分得出。

$$g_i = \frac{\partial V}{\partial X_i} \cdot \frac{X_i}{V} = \frac{\partial(\ln V)}{\partial(\ln X_i)} \tag{4-44}$$

同样，类似于单底物时式（4-42）的情形，速率常数为

$$a = V_P \cdot p_1^{-g_1}p_2^{-g_2}\cdots p_n^{-g_n} \tag{4-45}$$

例 4-5 反应动力学的幂函数近似法。

以厌氧条件下酵母批式发酵葡萄糖为例，其通用的模拟生长和产物抑制的模型为

$$\mu = \mu_{max}\frac{c_1}{K_1 + c_1} \cdot \frac{K_2}{K_2 + c_2} \tag{1}$$

式中：c_1 和 c_2 分别是底物葡萄糖和产物乙醇的浓度；K_1 是生长比速率最大值一半时的葡萄糖浓度；K_2 表征产物抑制作用。从式（1）可以看出，比生长速率函数 μ 依赖于 2 个变量，因此其幂函数近似方程有如下的符号形式：

$$\mu \approx a \cdot c_1^{g_1} \cdot c_2^{g_2} \tag{2}$$

利用偏微分计算动力学级数和速率常数为

$$g_1 = \frac{\partial\mu}{\partial c_1} \cdot \frac{c_1}{\mu} = \mu_{max}\frac{K_2}{K_2 + c_2} \cdot \frac{K_1}{(K_1 + c_1)^2} \cdot \frac{c_1}{\mu} = \frac{K_1}{K_1 + c_1} \tag{3}$$

$$g_2 = \frac{\partial\mu}{\partial c_2} \cdot \frac{c_2}{\mu} = \frac{-c_2}{K_2 + c_2} \tag{4}$$

$$a \approx \mu \cdot c_1^{-g_1} \cdot c_2^{-g_2} \tag{5}$$

值得注意的是，g_1 是正值，它表示较高的底物浓度产生较快的生长比速率，而 g_2 是负值，反映了乙醇的抑制作用。

4.5.3 *S* 系统方法

4.5.2 节利用幂函数形式描述了一般系统的反应动力学，为生物化学系统理论的模型化奠定了框架基础。一般在生化系统分析中，可以采用一系列微分方程表征系统动力学，每一个方程代表因变量 X_i 的变化。系统也可能包含自变量，它们在任何给定实验过程中都不变化，但改变实验条件时可能是不同的。

X_i 库的变化速率（$\dot{X}_i$）用通用形式表示为

$$\dot{X}_i = V_i^+(X_1, X_2, \cdots, X_n, X_{n+1}, X_{n+2}, \cdots, X_{n+m}) - V_i^-(X_1, X_2, \cdots, X_n, X_{n+1}, X_{n+2}, \cdots, X_{n+m}), \quad i = 1, 2, \cdots, n \tag{4-46}$$

式中，前 n 个变量 X_1，X_2，…，X_n 是相关的，而随后的 m 个变量 X_{n+1}，X_{n+2}，…，X_{n+m}是独立的。函数 V_i^+ 代表促进 X_i 生成的所有作用，而 V_i^- 代表促进 X_i 分解的所有作用。

以式（4-43）的形式描述式（4-46）中的幂函数 V_i^+ 和 V_i^- 的表达式，就得到对应的 S 系统表达式：

$$\dot{X}_i = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}}, \quad i = 1,2,\cdots,n \tag{4-47}$$

式（4-47）中每一项仅包括那些与动力学级数有关并对该项有直接影响的变量。例如，如果仅有 X_1, X_3, X_6 影响 V_2^-，那么它的表达式为

$$V_2^- = \beta_2 X_1^{h_{21}} X_3^{h_{23}} X_6^{h_{26}} \tag{4-48}$$

除 S 系统外，综合质量作用系统（GMA）也是一种常见的基于幂函数的表达形式，它将每个反应或过程分别列出，每个进入或离开代谢产物库的过程单独用幂函数的乘积来代替。

根据线性近似的原则，S 系统可以用分段方式表示。一旦变量离开操作点一定程度，都可以选择新的稳态操作点，重新计算幂函数近似表达式，并且分析转至新的参数表征。

下面以一个简单的分支反应例子来说明 S 系统方法。

例 4-6　分支反应的 S 系统表示。

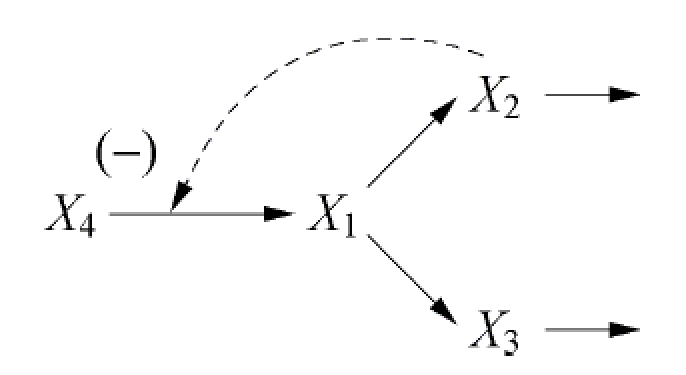


图 4-9　有抑制作用的分支反应

图 4-9 表示了一个有抑制作用的分支反应。系统有一个独立变量和 3 个非独立变量。初始底物用独立变量 X_4 表示，X_1 的生成受到独立输入变量 X_4 的影响，同时也受 X_2 的抑制作用。因此这两个变量都列入方程的生成项中。X_1 的降解仅与本身有关，虽然它流向 X_2、X_3，但是这两个变量仅仅是被动的接受，对 X_1 的降解速度没有直接影响。因此，图示的 S 系统方程表示如下：

$$\dot{X}_1 = \alpha_1 X_2^{g_{12}} X_4^{g_{14}} - \beta_1 X_1^{h_{11}}, \quad X_1(0) = X_1 \text{ 的初值}$$

$$\dot{X}_2 = \alpha_2 X_1^{g_{21}} - \beta_2 X_2^{h_{22}}, \quad X_2(0) = X_2 \text{ 的初值}$$

$$\dot{X}_3 = \alpha_3 X_1^{g_{31}} - \beta_3 X_3^{h_{33}}, \quad X_3(0) = X_3 \text{ 的初值}$$

$$\dot{X}_4 = \text{常数}$$

4.5.4　S 系统的灵敏度分析

灵敏度分析研究的是生化系统对偏离稳态的瞬时扰动的响应。在灵敏度分析中涉及两个重要的概念：对数增益（log gain）和灵敏度。

对数增益反映的是生物化学系统对独立变量变化的响应程度，典型的独立变量变化的例子是当生物从一个环境到另一个环境的条件变化。

灵敏度反映的是生物化学系统对其内部参数变化的响应程度，例如途径结构的改变、酶活力改变、基因突变等。

在系统处于稳定状态时，即使有扰动，所有变量值都保持恒定，即：

$$0 = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}}, \quad i = 1,2,\cdots,n \tag{4-49}$$

假设速率常数 α_i 和 β_i 都不为零，则可以将等式右边带负号的项都移到左边，通过取对数，就可以得到关于初始变量的对数线性方程，即：

$$\ln(\beta_i) + \sum_{j=1}^{n+m}[h_{ij}\ln(X_j)] = \ln(\alpha_i) + \sum_{j=1}^{n+m}[g_{ij}\ln(X_j)], \quad i = 1,2,\cdots,n \tag{4-50}$$

定义 $y_j = \ln(X_j)$，则：

$$\sum_{j=1}^{n+m} g_{ij}y_j - \sum_{j=1}^{n+m} h_{ij}y_j = \sum_{j=1}^{n+m}(g_{ij} - h_{ij})y_j = \ln(\beta_i) - \ln(\alpha_i), \quad i = 1,2,\cdots,n \tag{4-51}$$

最后，定义 $a_{ij} = g_{ij} - h_{ij}$，$b_i = \ln(\beta_i) - \ln(\alpha_i) = \ln(\beta_i/\alpha_i)$，那么具有 m 个独立变量以及 n 个非独立变量的 S 系统稳态可以用一组（n 个）线性方程表示出来，即：

$$a_{i1}y_1 + a_{i2}y_2 + \cdots + a_{in}y_n + a_{i,n+1}y_{n+1} + \cdots + a_{i,n+m}y_{n+m} = b_i, \quad i = 1,2,\cdots,n \tag{4-52}$$

对式（4-52）以矩阵形式表示，以 A_D 表示与非独立变量（$j = 1,2,\cdots,n$）相关的动力学级数，以 $\vec{y}_D$ 表示由非独立变量对数值组成的向量；A_I 表示与独立变量（$j = n+1,\cdots,n+m$）相关的对应量 $a_{ij}(a_{ij} = g_{ij} - h_{ij})$，以 $\vec{y}_I$ 表示由独立变量对数值组成的向量；以 $\vec{b}$ 表示由速率常数比值的对数值 b_j 组成的向量，则方程式（4－52）可简写为

$$\boldsymbol{A}_D \cdot \vec{y}_D + \boldsymbol{A}_I \cdot \vec{y}_I = \vec{b} \tag{4-53}$$

如果系统存在一个非零的稳态点，那么 $\boldsymbol{A}_D$ 存在逆矩阵，则非独立变量的值为：

$$\vec{y}_D = \boldsymbol{A}_D^{-1} \cdot \vec{b} - \boldsymbol{A}_D^{-1}\boldsymbol{A}_I \cdot \vec{y}_I = \boldsymbol{M} \cdot \vec{b} + L\vec{y}_I \tag{4-54}$$

式中，矩阵 $\boldsymbol{M} = \boldsymbol{A}_D^{-1}$，其组成元素即为引起速率常数变化的系统灵敏度，而乘积 $L = -A_D^{-1} \cdot A_I$，乘积 L 由对数增益 $L_{j,n+k} = L(X_j, X_{n+k})$ 组成。

在式（4-54）中，每一个灵敏度都量化了一个由速率常数如 α_i 的相对变化引起的非独立变量 X_i 的相对变化程度。在数学上，灵敏度是一个无限小的量：

$$S(X_i, \alpha_i) = \frac{\partial \ln(X_i)}{\partial \ln(\alpha_i)} = \frac{\partial y_i}{\partial \ln(\alpha_i)} \tag{4-55}$$

同理，每个对数增益 $L(X_j, X_{n+k})$ 都量化了由独立变量 X_{n+k} 的相对变化引起的非独立变量 X_j 的相对变化程度。在数学中，代谢产物的对数增益定义为

$$L(X_j, X_k) = \frac{\partial \ln(X_j)}{\partial \ln(X_k)} = \frac{\partial y_j}{\partial y_k} \tag{4-56}$$

灵敏度和对数增益将代谢途径的局部特性与整个系统的反应联系起来，研究这些局部特性，可用来判断模型设计是否存在错误。

除了上面所说的代谢产物浓度的对数增益之外，还存在作为独立变量的通量对数增益。假定系统处于稳态的前提下，变量的流入和流出是平衡的，那么选择哪一个通量来计算通量对数增益就无关紧要了。在 S 系统中，任意一个非独立变量 $X_i(i = 1,2,\cdots,n)$ 的稳态通量都可以表示为

$$V_i^+ = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} = \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}} = V_i^- \tag{4-57}$$

将等式两边取对数后，得到一个关于对数变量 $y_j = \ln(X_j)(j = 1,2,\cdots,n+m)$ 的线性方程。例如对于 V_i^+，可以得到：

$$\ln(V_i^+) = \ln(\alpha_i) + \sum_{j=1}^{n} g_{ij}y_j + g_{ik}y_k + \sum_{j=n+1,j\neq k}^{n+m} g_{ij}y_j \tag{4-58}$$

等式右边前 2 项含有速率常数和与非独立变量严格相关的要素，如果某个变量（如 y_k）发生变化，前两项是不受影响的；第 3 项表示 y_k 对流量 V_i^+ 的直接影响；而第 4 项反映的是由 y_k 变化引起的其他代谢产物响应所带来的间接影响。

类似地，关于 X_k 对通量 V_i^+ 的对数增益定义为与 y_k 变化相关的 $\ln(V_i^+)$ 或 $\ln(V_i^-)$ 的变化。这种变化同样可由偏微分方程求得，如下式：

$$\ln(V_i^+, X_k) = g_{ik} + \sum_{j=1}^{n} g_{ij}L_{jk} \tag{4-59}$$

式中，$L_{jk} = L(X_j, X_k)$ 指的是式（4-56）中所提到的代谢产物浓度增益 $\frac{\partial y_j}{\partial y_k}$。与 X_k 相关的通量 V_i^- 的增益同样可用下式表示：

$$\ln(V_i^-, X_k) = h_{ik} + \sum_{j=1}^{n} h_{ij}L_{jk} \tag{4-60}$$

由于稳态时 V_i^+ 和 V_i^- 是相等的，因此它们的增益也是相等的：

$$\ln(V_i^+, X_k) = \ln(V_i^-, X_k) \tag{4-61}$$

上面的表达形式直观地反映出系统在受到干扰前后都处于稳定状态，任何 V_i^+ 和 V_i^- 的变化都应具有相同的幅度。

实际上，对数增益的定义与前文所介绍控制系数是一致的：当 X_j 为代谢通量，X_k 为酶活力时，对数增益 $L(X_j, X_k)$ 即为通量控制系数；同样，当 X_j 为代谢产物浓度，X_k 为酶活力时，对数增益 $L(X_j, X_k)$ 即为浓度控制系数。因此，当代谢系统动力学模型已知时，很容易通过 *S* 系统表达形式求出这些控制系数。

灵敏度和对数增益在模型诊断方面是很有用的工具。高灵敏度和对数增益说明一个参数或独立变量的微小变化会对系统产生很强烈的影响。但在大多数情况下，要得到这种强烈的影响可能是不现实的，这表示模型中存在错误。

对数增益对于优化问题尤为重要。因为这些增益指出了每个非独立变量或通量受独立变量变化影响的程度，因此对数增益提供了一个可能对优化工作有用的独立变量筛选工具。如果一个独立变量的对数增益接近零，那么，即使这个变量发生很大变化也不会对系统产生多大影响。另一方面，如果目的代谢产物或通量对某个特定的独立变量的对数增益很高，这个变量就可能是优化产量或通量的一个非常好的选择。

4.5.5　代谢途径的 *S* 系统优化方法

进行代谢控制分析的目的在于：通过对代谢途径控制结构的了解，确定目的通量增大的通量分配方案。这是一个针对代谢系统的优化问题。

可以把代谢途径优化分为 5 类：第 1 类涉及反应速率和稳态通量的最大化；第 2 类致力于物质转化时间的最小化，即得到较高的产率；第 3 类是中间代谢产物浓度最小化；第 4 类是热力学效率的优化；第 5 类是最优的化学计量和代谢网络设计，最大理论得率计算即属于此类问题。

然而，实际的生物化学系统并非线性的。类似于生物代谢这样的复杂生化反应网络，都具有复杂的非线性动力学特征。对于非线性系统最优化问题，如果函数或约束条件非常复

杂，就不可能获得精确的分析解，而必须利用搜索算法寻找最优解。相对于非线性问题，线性系统的优化就要简单得多。因此，如果能将非线性优化转化为可解的线性问题，求解就容易得多了。

前面已经提到，可以在指定的稳态操作点处将通常的米氏速率函数形式转换为幂函数的 S 系统形式，通过进一步取对数的方式将其进行线性化。因此，适当条件下将代谢途径优化的非线性问题限定在合理线性化的范围内是完全可行的。

稳态条件下，S 系统形式通过取对数线性化，可以直接利用单纯形法进行优化计算，把对极值的搜索缩小到可行域的几个顶点上。典型的 S 系统优化问题包括以下一些方面。

目标函数（优化目标可以为目标途径的通量最大化、底物转化率最大化、代谢产物浓度最大化等）：

max ln（通量）

满足以下条件（可能只需满足部分条件也可能全部都满足）：

（1）稳态方程，用变量的对数形式表示；

（2）ln（独立或非独立变量）≤常数；

（3）ln（独立或非独立变量）≥常数；

（4）ln（独立或非独立变量）=常数；

（5）ln（独立或非独立变量）无限制条件；

（6）ln（通量）≤常数；

（7）ln（通量）≥常数；

（8）ln（通量）=常数；

（9）ln（通量1/通量2）无限制条件。

约束条件（2）和（3）规定了变量取值必须在一定范围内，在某些情况下，变量是不能改变的，这种情况可以通过约束条件（4）表示；而在其他的某种极端情况下，变量可以假定为任何正数，这种情况以约束条件（5）表示；条件（6）～（8）是关于通量的类似约束；条件（9）表示代谢流 V_i 和 V_j 的比值保持在某个界限以下。

上述目标函数和约束条件都可以通过取对数进行线性化，非线性优化问题就变成简单的线性规划了。

4.6 代谢工程的应用

4.6.1 代谢通量分析的应用

前面介绍了胞内代谢通量的计算方法以及利用代谢通量分析解析细胞代谢状态的重要性。应该强调的是，代谢通量是细胞生理学的最基本量度，与胞内代谢产物浓度一起，为揭示代谢通量控制的复杂机制提供了必要信息。因此，代谢通量分析并非简单的矩阵变换，而是试图获得细胞状态的全面状况，其与测得的胞内通量、放射性核素标记分布、GC-MS 以及其他特定的数据相一致。

为了对前文介绍的概念和方法加深理解，本节将利用两个代谢通量分析实例进行说明。以便更深入地理解细胞的代谢状态，并对湿实验提供有效的建议；而且，所述步骤可以为进行类似研究提供范本，以识别代谢网络中的关键分支点和最可能限制产物得率及产率的反应

步骤。

近年来已有很多文献报道了利用代谢通量分析的方法进行的研究，如：

（1）酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的厌氧生长：除计算代谢通量分布，还利用 MFA 分析了 *S. cerevisiae* 各种同工酶的可能作用，证实了这可以解释乙醇脱氢酶同工酶的作用。

（2）肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）厌氧发酵甘油的过程：通过 MFA 分析，研究了该菌株厌氧发酵甘油主要分支点的刚性。

（3）丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）生产溶剂的过程：利用 MFA 研究了产酸途径对溶剂生产的作用，发现丁酸合成相关酶在丁酸摄取过程中不需要与丙酮途径耦联，而乙酸合成相关酶对维持稳定阶段乙酸与乙酰辅酶 A 之间的碳循环有重要意义，据此，指导和验证了菌株代谢工程改造策略，重构了该菌株的基因组规模代谢网络模型，包括 502 个反应、479 种代谢产物，利用 MFA 成功预测了产酸阶段的代谢通量分布，并通过非线性规划计算了产溶剂阶段的代谢通量。

随着全基因组序列的陆续公布，代谢通量分析的范围也由局部或简单网络扩展到全局规模，但是，所用的基本步骤和方法仍然包含在本章前文所介绍的内容中。

4.6.2　代谢控制分析在微生物代谢工程中的应用——酿酒酵母发酵葡萄糖生产乙醇的代谢优化

乙醇是一种重要的液体燃料，很多国家和地区将其定位为传统化石燃料的重要替代品或补充。酵母及其他很多微生物都能利用可再生的原料生产乙醇，其中酵母的乙醇得率较高，是发酵生产乙醇最常见的微生物。有关酵母发酵的生化知识了解较为深入，关于菌体内葡萄糖消耗速率和乙醇及甘油生成速率的研究也很多，已经建立了比较完善的有关代谢产物动力学，丰富的定性和定量信息为进行代谢途径优化分析提供了充分依据。

本节将以酿酒酵母厌氧转化葡萄糖为乙醇、甘油、糖原为例，阐述如何通过已有的动力学方程来建立 *S* 系统模型，并通过 *S* 系统模型进行代谢控制分析和优化。

1. 葡萄糖发酵产乙醇的代谢机制　根据文献相关信息，简化的代谢途径模型如图 4-10 所示，用传统的米氏反应可推导建立相关的动力学方程。

（1）模型的第一步是胞外葡萄糖转运到胞内，这个步骤不能省略，实验中胞外葡萄糖浓度易于控制，而且转运步骤被 6-磷酸葡萄糖抑制，因而这一步是重要的调控点。

（2）转运到胞内的葡萄糖被己糖激酶磷酸化，生成 6-磷酸葡萄糖。在胞内，6-磷酸葡萄糖是整个代谢途径的第一个分支点（该例中仅考虑两个重要的分支：一是糖酵解的主要支路，生成乙醇；另一支路负责多糖（糖原）和海藻糖的生成。进入磷酸戊糖途径的流量在工业条件下并不明显，因而被忽略）。6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖由于很容易相互转化，所以在模型中将它们合在一起。

（3）接下来，磷酸果糖激酶将果糖磷酸化，生成 1, 6-二磷酸果糖。如果 1, 6-二磷酸果糖激酶有活性，6-磷酸果糖和 1, 6-二磷酸果糖间的无效循环可能会很重要。但在工业化试验中，这种酶是典型的无活性酶，无效循环因此不包含在模型中。1, 6-二磷酸果糖可以用来生产甘油或磷酸烯醇式丙酮酸。最后，磷酸烯醇式丙酮酸被丙酮酸激酶转化生成乙醇，这一步被 1, 6-二磷酸果糖激活。

（4）建模过程中，除了这些主要途径的反应，还需要考虑 ADP 和 ATP 间的转化。

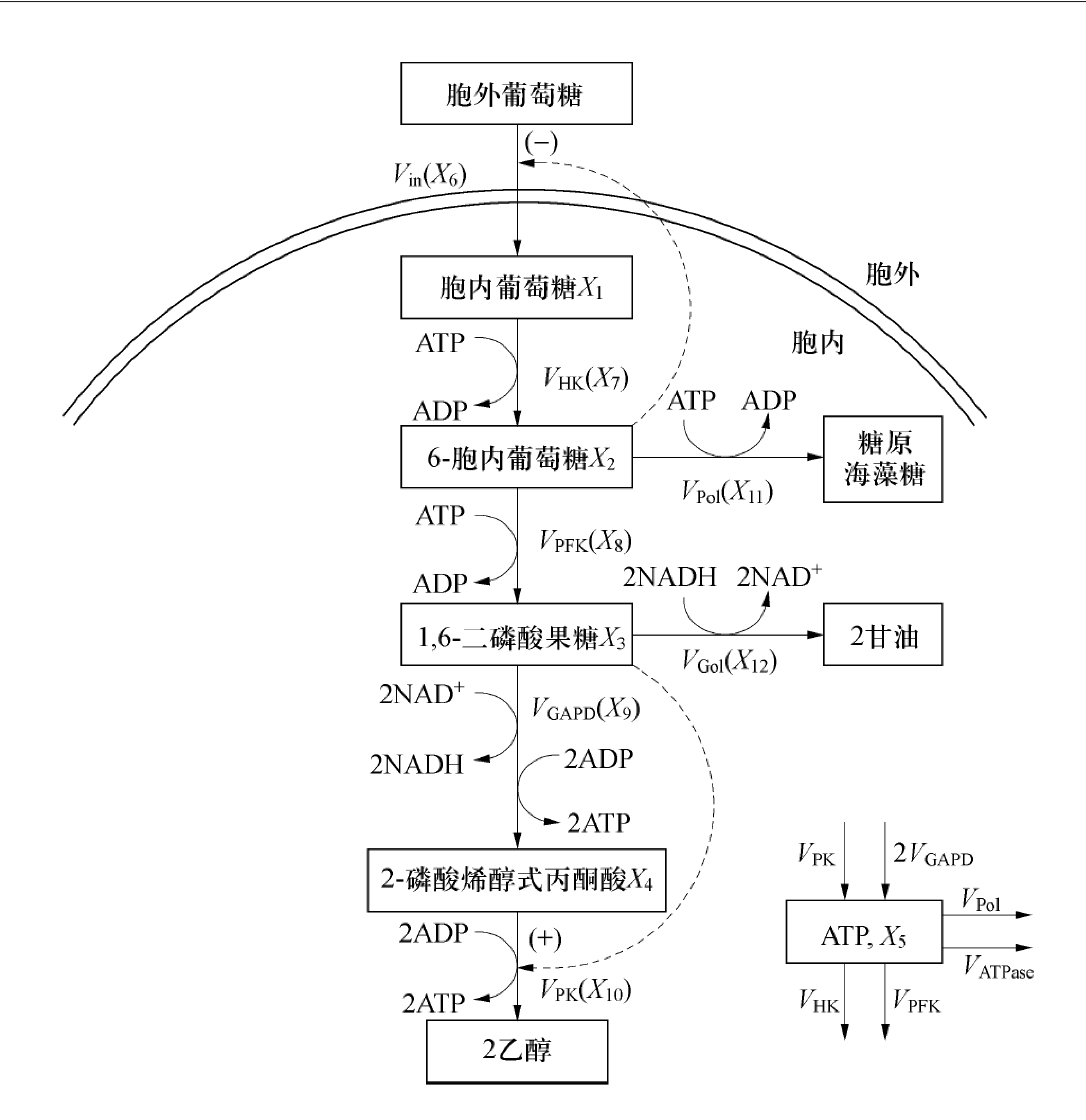


图 4-10　酿酒酵母厌氧转化葡萄糖生产乙醇、甘油和多糖的简化模型

实线箭头代表反应，虚线箭头代表调控

2. 物料平衡方程　据图 4-10 可以列出物料平衡方程式（4-62），中间产物浓度的变化速率：

$$\begin{cases}\dot{X}_1 = V_{in} - V_{HK} \\ \dot{X}_2 = V_{HK} - V_{PFK} - V_{Pol} \\ \dot{X}_3 = V_{PFK} - V_{GAPD} - 0.5V_{Gol} \\ \dot{X}_4 = 2V_{GAPD} - V_{PK} \\ \dot{X}_5 = 2V_{GAPD} + V_{PK} - V_{HK} - V_{Pol} - V_{PFK} - V_{ATPase}\end{cases} \tag{4-62}$$

式中，变量 $\dot{X}_i$ 代表中间代谢产物的浓度变化速率，$\dot{X}_1$ 表示葡萄糖，$\dot{X}_2$ 表示 6-磷酸葡萄糖，$\dot{X}_3$ 表示 1, 6-二磷酸果糖，$\dot{X}_4$ 表示磷酸烯醇式丙酮酸，$\dot{X}_5$ 表示 ATP；V 代表如下流量：V_{in} 表示被运到胞内的糖，V_{HK} 表示己糖激酶催化的反应；V_{PFK} 表示磷酸果糖激酶催化的反应；V_{GAPD} 表示 3-磷酸甘油醛脱氢酶反应；V_{PK} 表示丙酮酸激酶反应；V_{Pol} 表示糖原合成酶反应；V_{Gol} 表示 3-磷酸甘油脱氢酶反应，与 V_{PK} 成正比；V_{ATPase} 表示 ATP 的总用量。乙醇的生产速率被丙酮酸激酶的反应通量 V_{PK} 所控制，生成乙醇的通量可记作 V_{Eth}。

显然，$\dot{X}_1$、$\dot{X}_2$、$\dot{X}_3$、$\dot{X}_4$、$\dot{X}_5$ 均为非独立变量，而胞外葡萄糖浓度、酶活力和酶量为独立变量，它们影响代谢途径但本身不被系统的动力学状态影响。据此，研究人员给出了详

细的稳态条件下代谢产物浓度、酶活力和反应通量实验值，如表 4-2 ~ 表 4-3 所示。表中 6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖、1, 6-二磷酸果糖和 3-磷酸甘油酸的胞内浓度是通过胞内^{31}P-NMR 获得的糖磷酸盐的共振响应来估计的，葡萄糖的利用及其向不同终产物的转化则通过^{13}C-葡萄糖的 NMR 谱测定。

表 4-2　发酵途径主要胞内产物的稳态浓度

代谢产物	缩写	符号	浓度（$mmol \cdot L^{-1}$）
胞内葡萄糖	Glc（in）	X_1	0. 035
6-磷酸葡萄糖	G6P	X_2	1. 01
1, 6-二磷酸果糖	FDP	X_3	9. 14
磷酸烯醇式丙酮酸	PEP	X_4	0. 0095
三磷酸腺苷	ATP	X_5	1. 13
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸比率	$NADH/NAD^+$	X_{14}	0. 042（无单位）

表 4-3　发酵途径的最大酶活力、反应通量（$mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$）

酶/步骤	缩写	符号	最大酶活力	代谢通量
葡萄糖转运	V_{in}^{M}	X_6	19. 7	15. 96
己糖激酶	V_{HK}^{M}	X_7	68. 5	15. 96
1-磷酸果糖激酶	V_{PFK}^{M}	X_8	31. 7	15. 94
甘油醛脱氢酶	V_{GAPD}^{M}	X_9	49. 9	15. 06
丙酮酸激酶	V_{PK}^{M}	X_{10}	3440	30. 11
多糖生物合成	V_{Pol}^{M}	X_{11}	14. 3	0. 014
甘油生物合成	V_{Gol}^{M}	X_{12}	203	1. 777
ATP 酶	V_{ATPase}^{M}	X_{13}	25. 1	28. 31

次生代谢产物如 ATP 和 NADH 在模型中未明确标出，但对代谢途径动力学是有直接影响的，需要充分考虑。NADH 和 NAD^+ 之间以及腺苷酸碱的转化是间接定量的，因为 $NADH/NAD^+$ 十分恒定，所以被视为独立变量。实验结果进一步证实，NADH 和 NAD^+ 的总量大约为 $2mmol \cdot L^{-1}$，各自的浓度分别为：$c_{NADH} = 0.081mmol \cdot L^{-1}$，$c_{NAD^+} = 1.919mmol \cdot L^{-1}$。

3. 动力学模型　对于图 4-10 所示的代谢途径，Galazzo 和 Bailey 已给出详细的动力学模型。

（1）糖运输：$V_{in} = V_{in}^{0} + K_{G6P} c_{G6P}$ （4-63）

式中，$V_{in}^{0} = 19.7mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$；$K_{G6P} = -3.7min^{-1}$。

（2）己糖激酶步骤：$V_{HK} = \dfrac{V_{HK}^{M}}{\dfrac{K_G^s K_{ATP}^M}{G_{in} c_{ATP}} + \dfrac{K_G^M}{G_{in}} + \dfrac{K_{ATP}^M}{c_{ATP}} + 1}$ （4-64）

式中，$V_{HK}^{M} = 68.5$；$K_G^s = 0.0062$；$K_G^M = 0.11$；$K_{ATP}^M = 0.1$。

（3）6-磷酸葡萄糖降解步骤

① 磷酸果糖激酶反应：

$$V_{PFK} = V_{PFK}^{M} \frac{10c_{F6P}\frac{c_{ATP}}{0.6}R}{R^2 + L_0(L_1T)^2}$$

$$R = 1 + c_{F6P} + \frac{c_{ATP}}{0.6} + 10c_{F6P}\frac{c_{ATP}}{0.6}$$

$$L_0 = \exp(4.17 \times pH^{in} - 20.4225) - 1658.22$$

$$L_1 = \frac{1 + 0.76c_{AMP}}{1 + 40c_{AMP}}$$

$$T = 1 + 0.0005c_{F6P} + \frac{c_{ATP}}{0.6} + 0.0005c_{F6P}\frac{c_{ATP}}{0.6} \tag{4-65}$$

式中，$V_{PFK}^{M} = 31.7$；F6P 表示 6-磷酸果糖。

② 糖原合成酶催化反应：

$$V_{Gly} = V_{Gly}^{app}\frac{1}{\frac{K_0^M}{c_{UDPG}}\left(1 + \frac{K^M}{c_{G6P}}\right) + 1} \tag{4-66}$$

式中，$K_0^M = 1$，$K^M = 1.1$。

（4）1,6-二磷酸果糖降解步骤

① 3-磷酸甘油醛脱氢酶反应：

$$V_{GAPD} = V_{GAPD}^{M}\left[1 + \frac{K_{G3P}}{c_{G3P}} + \frac{K_{NAD^+}}{c_{NAD^+}}\left(1 + \sum_{i=1}^{3}\frac{\zeta_i}{K_i}\right) + \frac{K_{G3P}K_{NAD^+}}{c_{G3P}c_{NAD^+}}\left(1 + \frac{c_{NADH}}{K_{I,NADH}}\right)\left(1 + \sum_{i=1}^{3}\frac{\zeta_i}{K_i}\right)\right]^{-1} \tag{4-67}$$

式中，$V_{GAPD}^{M} = 49.9$，$K_{G3P} = 0.0025$，$K_{NAD^+} = 0.18$，$K_{I,NADH} = 0.003$，$K_1 = 1.1$，$K_2 = 1.5$，$K_3 = 2.5$。

② 3-磷酸甘油脱氢酶反应：

$$V_{Gol} = \frac{V_{Gol}^{M}}{V_{PK}^{M}}V_{PK} \tag{4-68}$$

（5）丙酮酸激酶反应

$$V_{PK} = \frac{V_{PK}^{M}}{1 + \frac{K_{pH}}{c_{H^+}}} \cdot \frac{g_R\lambda_1\lambda_2R^{n-1} + g_Tc_1\lambda_1c_2\lambda_2T^{n-1}}{R^n + LT^n} \tag{4-69}$$

式中，$\lambda_1 = \frac{c_{PEP}}{K_{R,PEP}}$，$\lambda_2 = \frac{c_{ADP}}{K_{R,ADP}}$，$\gamma = c_{FDP}/K_{R,FDP}$，$c_j = K_{R,j}/K_{T,j}$，$q = V_{T,M}/R_{T,M}$，$L = L_0\left(\frac{1 + c_\gamma\gamma}{1 + \gamma}\right)^n$，$R = 1 + \lambda_1 + \lambda_2 + g_R\lambda_1\lambda_2$，$T = 1 + c_1\lambda_1 + c_2\lambda_2 + g_Tc_1\lambda_1c_2\lambda_2$。

（6）ATP 动力学

$$V_{ATPase} = V_{ATPase}^{M}c_{ATP} \tag{4-70}$$

AMP、ADP 和 ATP 浓度随时间变化，但腺苷酸总量波动不大。该模型中假定其为恒定值，即 $c_{AMP} + c_{ADP} + c_{ATP} = 3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$，腺苷酸间的转化由腺苷酸激酶催化：

$$K_{ep} = \frac{c_{ADP}^2}{c_{ATP}c_{AMP}} = 1 \tag{4-71}$$

由上述两式可得：

$$c_{ADP} = \frac{1}{2}\sqrt{12c_{ATP} - 3c_{ATP}^{2}} - c_{ATP}$$

$$c_{AMP} = 3 - c_{ATP} - c_{ADP} \tag{4-72}$$

Galazzo 和 Bailey 发现稳态条件下，$c_{ATP} = 1.1278 \mathrm{mmol \cdot L^{-1}}$，因此：

$$c_{ADP} = 0.9948 \mathrm{mmol \cdot L^{-1}}, \quad c_{AMP} = 0.8774 \mathrm{mmol \cdot L^{-1}}$$

此外，Galazzo 和 Bailey 还确定了 6-磷酸果糖、3-磷酸甘油醛、3-磷酸甘油酸和 UDPG 与一些模型变量之间的平衡关系：

$$c_{F6P}/c_{G6P} = 0.3$$

$$c_{G3P}/c_{FDP} = 0.01$$

$$c_{PEP}/c_{G3P} = 0.1$$

$$c_{G6P}/c_{UDPG} = 1.444$$

4. 建立 GMA 方程　首先建立 GMA 方程比直接利用 *S* 系统表示形式更容易。对应于式（4-62）的 GMA 方程为：

$$\begin{cases} \dot{X}_1 = V_1^+ - V_1^- \\ \dot{X}_2 = V_2^+ - V_{21}^- - V_{22}^- \\ \dot{X}_3 = V_3^+ - V_{31}^- - V_{32}^- \\ \dot{X}_4 = V_4^+ - V_4^- \\ \dot{X}_5 = V_{51}^+ + V_{52}^+ - V_{51}^- - V_{52}^- - V_{53}^- - V_{54}^- \end{cases} \tag{4-73}$$

对应图 4-10 将直接影响 GMA 方程中各项的变量包含在生成和降解项中，如：

$$\begin{cases} \dot{X}_1 = \alpha_1 X_2^{g_{12}} X_6^{g_{16}} - \beta_1 X_1^{h_{11}} X_5^{h_{15}} X_7^{h_{17}} \\ \dot{X}_2 = \alpha_2 X_1^{g_{21}} X_5^{g_{25}} X_7^{g_{27}} - \beta_{2,1} X_2^{h_{22,1}} X_5^{h_{25,1}} X_8^{h_{28,1}} - \beta_{2,2} X_2^{h_{22,2}} X_{11}^{h_{2,11,2}} \\ \dot{X}_5 = \alpha_{5,1} X_3^{g_{53,1}} X_5^{g_{55,1}} X_9^{g_{59,1}} X_{14}^{g_{5,14,1}} + \alpha_{5,2} X_3^{g_{53,2}} X_4^{g_{54,2}} X_5^{g_{55,2}} X_{10}^{g_{5,10,2}} - \beta_{5,1} X_1^{h_{51,1}} X_5^{h_{55,1}} X_7^{h_{57,1}} \\ \qquad - \beta_{5,2} X_2^{h_{52,2}} X_{11}^{h_{5,11,2}} - \beta_{5,3} X_2^{h_{52,3}} X_5^{h_{55,3}} X_8^{h_{58,3}} - \beta_{5,4} X_5^{h_{55,4}} X_{13}^{h_{5,13,4}} \end{cases} \tag{4-74}$$

其他各式类同。

对于 GMA 模型中的动力学级数和速率常数，可根据式（4-41）结合动力学模型求取。以式（4-62）方程 1 为例，方程右边包含两项：糖运输步骤和已糖激酶步骤。

（1）糖运输步骤：已知糖运输步骤的动力学方程式（4-63），在 GMA 模型（4-74）中需要确定 2 个动力学级数：g_{12}和 g_{16}，前者表示 6-磷酸葡萄糖对糖运输步骤的抑制作用，按动力学级数的确定方程式（4-41）可得：

$$g_{12} = \frac{\partial (V_{in}^0 + K_{G6P} c_{G6P})}{\partial c_{G6P}} \cdot \frac{c_{G6P}}{V_{in}} = K_{G6P} \frac{c_{G6P}}{V_{in}} \tag{4-75}$$

根据表 4-2 和表 4-3 所确定的稳态操作条件：

$V_{in}^0 = 19.7 \mathrm{mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}}$，$K_{G6P} = -3.7 \mathrm{min^{-1}}$，$V_{in} = 15.96 \mathrm{mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}}$，于是 $g_{12} = -0.2344$。

动力学级数 g_{16}与胞外基质浓度有关，这是一个不受调节的运输过程，其动力学级数默认为 1。

同样，根据式（4-42）可求出速率常数：

$$\alpha_1 = V_{in} X_2^{-g_{12}} X_6^{-g_{16}} = 15.96 \times 1.011^{0.2344} \div 19.7 = 0.8122$$

（2）己糖激酶步骤：在 GMA 模型中，影响己糖激酶步骤的变量包括 3 项：胞内葡萄糖、己糖激酶和 ATP。同上，根据己糖激酶步骤的动力学方程式（4-64）可求得对应的动力学级数和速率常数：

$h_{11} = 0.7464$

$h_{15} = 0.0243$

$h_{17} = 1$

$\beta_1 = 2.8632$

同样可求出 GMA 模型中其他方程式的参数。

5. *S* 系统表示法 建立 GMA 模型之后可建立对应的 *S* 系统表达形式，对代谢产物建立平衡方程：

$$\dot{X}_i = V_i^+ - V_i^-, \quad i = 1, 2, 3, 4, 5 \tag{4-76}$$

将影响各代谢产物的变量代入平衡方程可得：

$$\begin{aligned}
\dot{X}_1 &= \alpha_1 X_2^{g_{12}} X_6^{g_{16}} - \beta_1 X_1^{h_{11}} X_5^{h_{15}} X_7^{h_{17}} \\
\dot{X}_2 &= \alpha_2 X_1^{g_{21}} X_5^{g_{25}} X_7^{g_{27}} - \beta_2 X_2^{h_{22}} X_5^{h_{25}} X_8^{h_{28}} X_{11}^{h_{2,11}} \\
\dot{X}_3 &= \alpha_3 X_2^{g_{32}} X_5^{g_{35}} X_8^{g_{38}} - \beta_3 X_3^{h_{33}} X_4^{h_{34}} X_5^{h_{35}} X_9^{h_{39}} X_{12}^{h_{3,12}} X_{14}^{h_{3,14}} \\
\dot{X}_4 &= \alpha_4 X_3^{g_{43}} X_5^{g_{45}} X_9^{g_{49}} X_{14}^{g_{4,14}} - \beta_4 X_3^{h_{43}} X_4^{h_{44}} X_5^{h_{45}} X_{10}^{h_{4,10}} \\
\dot{X}_5 &= \alpha_5 X_3^{g_{53}} X_4^{g_{54}} X_5^{g_{55}} X_9^{g_{59}} X_{10}^{g_{5,10}} X_{14}^{g_{5,14}} - \beta_5 X_1^{h_{51}} X_2^{h_{52}} X_5^{h_{55}} X_7^{h_{57}} X_8^{h_{58}} X_{11}^{h_{5,11}} X_{13}^{h_{5,13}}
\end{aligned} \tag{4-77}$$

为求得 *S* 系统表达式中各参数值，需要将其与 GMA 模型的对应项关联起来。对比式（4-77）和式（4-74），代谢产物 X_1 和 X_4 的平衡方程生成项和降解项都分别只有一项，因此 *S* 系统形式和 GMA 形式完全一致。而 GMA 模型中其他 3 个代谢产物平衡方程的生成项和降解项的表达式都多于一项，因此需要分别对 GMA 模型的生成项和降解项进行合并以确定 *S* 系统形式的参数值。

以代谢产物 X_2 为例，两种形式表示法中生成项是一致的，但 GMA 模型中降解项有两项，因此：

$$\beta_2 X_2^{h_{22}} X_5^{h_{25}} X_8^{h_{28}} X_{11}^{h_{2,11}} = \beta_{2,1} X_2^{h_{22,1}} X_5^{h_{25,1}} X_8^{h_{28,1}} + \beta_{2,2} X_2^{h_{22,2}} X_{11}^{h_{2,11,2}} \tag{4-78}$$

同样利用式（4-41）的方法确定动力学级数。以参数 h_{22} 为例，对于指定的稳态操作条件下：

$$\begin{aligned}
h_{22} &= \frac{\partial(\beta_{2,1} X_2^{22,1} X_5^{25,1} X_8^{28,1} + \beta_{2,2} X_2^{22,2} X_{11}^{2,11,2})}{\partial X_2} \times \frac{X_2}{\beta_{2,1} X_2^{22,1} X_5^{25,1} X_8^{28,1} + \beta_{2,2} X_2^{22,2} X_{11}^{2,11,2}} \\
&= \frac{h_{22,1}(\beta_{2,1} X_2^{22,1} X_5^{25,1} X_8^{28,1}) + h_{22,2}(\beta_{2,2} X_2^{22,2} X_{11}^{2,11,2})}{\beta_{2,1} X_2^{22,1} X_5^{25,1} X_8^{28,1} + \beta_{2,2} X_2^{22,2} X_{11}^{2,11,2}} \\
&= \frac{0.7318 \times 30.11 + 8.6107 \times 0.014}{30.11 + 0.014} = 0.735
\end{aligned}$$

同理，可求得参数 h_{25}、h_{28} 和 $h_{2,11}$ 的值。求得上述 *S* 系统形式的动力学级数后即可以确定速率常数 β_2：

$$\beta_2 = \frac{\beta_{2,1} X_2^{22,1} X_5^{25,1} X_8^{28,1} + \beta_{2,2} X_2^{22,2} X_{11}^{2,11,2}}{X_2^{h_{22}} X_5^{h_{25}} X_8^{h_{28}} X_{11}^{h_{2,11}}} = 0.5239$$

代回到式（4-77）即可得 *S* 系统模型：

$$\begin{cases} \dot{X}_1 = 0.8122X_2^{-0.2344}X_6 - 2.8632X_1^{0.7464}X_5^{0.0243}X_7 \\ \dot{X}_2 = 2.8632X_1^{0.7464}X_5^{0.0243}X_7 - 0.5239X_2^{0.735}X_5^{-0.394}X_8^{0.999}X_{11}^{0.001} \\ \dot{X}_3 = 0.5232X_2^{0.7318}X_5^{-0.3941}X_8 - 0.0148X_3^{0.584}X_4^{0.03}X_5^{0.119}X_9^{0.944}X_{12}^{0.056}X_{14}^{-0.575} \\ \dot{X}_4 = 0.022X_3^{0.6159}X_5^{0.1308}X_9X_{14}^{-0.6088} - 0.0945X_3^{0.05}X_4^{0.533}X_5^{-0.0822}X_{10} \\ \dot{X}_5 = 0.0913X_3^{0.333}X_4^{0.266}X_5^{0.024}X_9^{0.5}X_{10}^{0.5}X_{14}^{-0.304} - 3.2097X_1^{0.198}X_2^{0.196}X_5^{0.372}X_7^{0.265}X_8^{0.265}X_{11}^{0.0002}X_{13}^{0.47} \end{cases} \tag{4-79}$$

在确定 S 系统模型后，需要考察模型本身的有效性：对于一个合理模型，当系统中一个变量发生轻微扰动后，经过一段时间，模型应该可以回到稳态；同时系统中一个参数或独立变量的微小扰动也不应引起模型的巨大变化。

6. 乙醇生产的优化

（1）目标函数：在 S 系统模型中代表乙醇通量的项 V_4^- 对应于丙酮酸激酶步骤，在式（4-79）中为

$$V_4^- = V_{\mathrm{Eth}} = 0.0945X_3^{0.05}X_4^{0.533}X_5^{-0.0822}X_{10} \tag{4-80}$$

对该式取对数线性化，并令 $y_i = \ln(X_i)$，可得目标函数：

$$\ln V_4^- = 0.05y_3 + 0.533y_4 - 0.0822y_5 + y_{10} + \ln 0.0945 \tag{4-81}$$

（2）约束条件：稳态约束条件可由 S 系统模型（4-79）对数线性化导出。

另外，独立变量的约束条件可以用来确定酶活力变化范围，一般来讲，酶活力在其基值的 1～50 倍范围变化在生物技术上是可行的，然而，为保证发酵过程以外的代谢不受干扰，目的途径代谢通量相关的酶要保持恒定的稳态基值。为此，酶活力被控制在恒定基值的酶包括糖原合成酶（X_{11}）和 3-磷酸甘油脱氢酶（X_{12}）。有了这些设定，为使每个通量最大化可得到控制变化的如下对数约束条件：

$$2.980 \leqslant y_6 \leqslant 6.892$$
$$4.226 \leqslant y_7 \leqslant 8.138$$
$$3.456 \leqslant y_8 \leqslant 7.368$$
$$3.910 \leqslant y_9 \leqslant 7.822$$
$$8.143 \leqslant y_{10} \leqslant 12.055$$
$$y_{11} = 2.66,\ y_{12} = 5.313$$
$$3.222 \leqslant y_{13} \leqslant 7.134$$

当然，代谢产物浓度（非独立变量）的变化范围也要受到限制。该处设定非独立变量的上下限分别为其基值的 0.8～1.2 倍，这样就可以避免细胞的所有代谢通量发生显著变化。由于 NAD^+ 和 NADH 参与了其他代谢途径，因此虽然 $NADH/NAD^+$（X_{14}）可以作为独立的控制变量处理，但应该保持恒定值。据此，稳态约束条件中相关代谢产物浓度约束条件为

$$-3.604 \leqslant y_1 \leqslant -3.199$$
$$-0.213 \leqslant y_2 \leqslant 0.192$$
$$1.989 \leqslant y_3 \leqslant 2.395$$
$$-4.879 \leqslant y_4 \leqslant -4.474$$
$$-0.109 \leqslant y_5 \leqslant 0.304$$

此外，还有一个化学计量约束条件：$V_1^+/V_4^- > 0.5$。

这一约束限定了乙醇生成速率 V_4^- 不能大于输入通量的2倍，式中的0.5表示每个二磷酸果糖分子（X_3）分解成2个磷酸烯醇式丙酮酸分子（X_4）。同样，以式（4-62）的对应项代入上式并取对数得到通量约束为

$$-0.2344y_2-0.05y_3-0.533y_4+0.0822y_5+y_6-y_{10}>-2.842$$

（3）优化结果：*S* 系统模型乙醇生产最优化计算结果列于表4-4中，同时该表还列出了直接利用米氏动力学计算的结果。

表4-4　乙醇生产速率最大的优化结果

项　目	基态解	*S* 系统解	米氏动力学解
优化的酶活力变化速率（$mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$）	$(X_i)_{base}$	$X_i/(X_i)_{base}$	$X_i/(X_i)_{base}$①
X_6	19.7	3.15	3.15
X_7	68.5	3.58	3.58
X_8	31.5	2.42	2.42
X_9	49.9	2.94	2.94
X_{10}	3440	2.82	2.82
X_{13}	25.1	4.25	4.25
优化系统的代谢产物浓度（$mmol \cdot L^{-1}$）	$(X_i)_{base}$	$X_i/(X_i)_{base}$	$X_i/(X_i)_{base}$②
X_1	0.034	0.8	0.96
X_2	1.01	1.2	1.73
X_3	9.14	1.2	1.42
X_4	0.0095	1.2	1.57
X_5	1.13	0.8	0.85
优化系统的流量（$mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$）	$(V_i)_{base}$	$V_i/(V_i)_{base}$	$V_i/(V_i)_{base}$②
V_{Gol}	1.77	1.11	1.25
V_{Pol}	0.014	4.8	83.84
V_{Eth}	30.11	3.2	3.48

注：①通过 *S* 系统模型线性化优化计算出的值；②通过 *S* 系统模型优化的值代替米氏模型中的控制变量计算出的值。

从表4-4可以看出，最优解只需要相关酶中等水平的过量表达（2.42～4.25倍），这种要求在酵母中很容易达到。

由于 *S* 系统和米氏模型之间数学计算上的差异，3个中间代谢产物 X_2、X_3、X_4 实际超出了其限值。值得注意的是，大多数通量在米氏模型中只是略有提高，但 V_{Pol} 却比 *S* 系统预测的要高得多，这说明可能需要在优化过程中重新考虑各不同变量的设定约束条件。

另外，根据表4-4，需要对全部的酶活力进行改变才能得到优化的结果，要实现这一点需要大量的实验工作，因此更合理的预测是能否通过调节少数酶就可以得到类似的结果。采用这种优化方式的乙醇次优化结果如表4-5所示。对于每一个可调节的酶，表4-5的组合反应步骤都得到了稳定、可行的解，它对应于给定条件下可能的最高目的通量。很明显，为显著提高乙醇通量必须同时调节6种酶。

表 4-5 参与酿酒酵母生产乙醇酶变化的优化解

方案序号	酶活力调控 $X_i/(X_i)_{base}$						$V_{Eth}/(V_{Eth})_{base}$ ①
	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{13}	
1	1.15						1.12
2	1.15					1.14	1.13
3	1.06		1.4		1.28		1.13
4	1.09		1.45	1.31	1.35		1.16
5	1.30	1.1		1.5	1.42	1.61	1.29
6	3.15	3.58	2.42	2.94	2.82	4.25	3.48

①米氏方程解。

4.6.3 代谢分析在动、植物细胞代谢中的应用——哺乳动物细胞培养的代谢通量分析

细胞培养生产复杂蛋白质药物的技术在近年来发展很快，成为利用原核细胞生产非糖基化蛋白如人生长激素、胰岛素、α-干扰素等之后发展最为快速的领域之一。目前，利用哺乳动物细胞生产的一些生物医药已在市场上大量销售，如促红细胞生成素（EPO）、组织纤溶酶原激活因子（TPA）及粒细胞集落刺激因子（G-CSF）等，另有更多的类似新药正在进行临床试验和审批，这有望提升人类的健康和生活质量。因此，哺乳动物细胞培养和代谢研究正吸引越来越多人的关注。本小节将通过实例介绍哺乳动物细胞培养中的代谢通量分析。

哺乳动物细胞培养获得高生产能力的主要限制因素是细胞密度低，主要原因是细胞生长期间葡萄糖代谢和谷胺酰胺代谢的抑制性副产物（如乳酸和氨）大量积累。由于上述副产物与中央代谢直接相关，因此，有必要进行代谢通量分析，以确定导致副产物生成的主要糖类和氨基酸通量分布。

在杂交瘤细胞系 ATCC CRL 1606 生产抗人纤连蛋白的免疫球蛋白 G（IgG）的系统中，杂交瘤细胞是采用标准的 DMEM 培养基在充分搅拌的生物反应器中进行培养的。表 4-6 列出了 2 个实验条件下所测的代谢产物。方案 1 中，当每毫升培养基中细胞浓度为 4.8×10^5cell · ml^{-1} 时加入标记葡萄糖，且乳酸盐积累 20h；方案 2 中，每毫升培养基中细胞数量达到 6.8×10^5cell · ml^{-1}时加入标记葡萄糖，且乳酸盐积累 10h。

表 4-6 杂交瘤细胞培养中所测代谢产物生成或消耗速率①

代谢产物	方案 1	方案 2	代谢产物	方案 1	方案 2
葡萄糖	−2.92×0.16	−3.9×0.19	生物质	3.71×0.19	3.97×0.20
丙氨酸	0.31×0.03	0.31×0.03	O_2	−2.0×0.2	−2.0×0.2
乳酸盐	6.2×0.32	7.03×0.35	CO_2	2.6×0.3	2.6×0.3
谷胺酰胺	−0.86×0.09	−1.1×0.1	IgG	0.96×0.1	0.99×0.1
氨	0.73×0.07	−0.70×0.07			

①所有速率以每细胞 10^{-10}mmol · h^{-1}表示，负号表示消耗，生物质和 IgG 的单位分别以 C－mol 和 N－mol 表示。

向生物反应器液面上空间通入氮气，溶氧浓度（c_O）从 60% 衰减至大约 20%，对氧比

吸收速率 r_{O_2}（mmol · cell^{-1} · h^{-1}）进行动态测量。下式用来计算氧比吸收速率，其中传质系数 $k_L\alpha$ 是独立测量的：

$$\frac{dc_O}{dt} = k_L\alpha(c_O^* - c_O) - r_O x \tag{4-82}$$

式中：c_O^* 为与气相平衡时的溶氧浓度；x 为生物反应器中的细胞浓度。

深层培养时，哺乳动物细胞的主要碳源和能量来源是葡萄糖和谷氨酰胺。同时，谷氨酰胺也是主要的氮源。杂交瘤细胞培养过程中，还要消耗其他氨基酸，且消耗量接近谷氨酰胺的 50%，其中 80% 消耗于蛋白质合成，因此，谷氨酰胺以外的其他氨基酸对产能贡献很少。其他成分，如维生素、微量元素以及生长因子对细胞生长有显著效果，但对能量代谢贡献非常小。葡萄糖和谷氨酰胺代谢的主要产物是生物质、以抗体形式分泌的蛋白质、能量、用于生物合成的还原度、二氧化碳，副产物为乳酸和氨。此外，根据细胞系和生长条件不同，也可能分泌天冬氨酸、丙氨酸和谷氨酸。与正常组织相反，杂交瘤细胞培养一般表现出高速率糖酵解，这是葡萄糖经糖酵解转化为丙酮酸的结果。葡萄糖也可经戊糖磷酸途径代谢产生 NADPH 和生物合成中间体。丙酮酸可转化为乳酸，或经转氨作用形成丙氨酸。此外，丙酮酸也可通过回补途径被羧化，或通过苹果酸酶反应转化回丙酮酸。在生物质合成方程中，要将脂质合成考虑进去，但在计算乳酸中的^{13}C 分布时，可不予考虑。对 CRL 1606 杂交瘤细胞，葡萄糖和谷氨酰胺是主要的能源来源，而氨、乳酸和丙氨酸是主要的产物。

图 4-11 描述了哺乳动物细胞中的能量代谢生物化学途径。通过将线性反应中的中间代谢产物合并，代谢网络已得到简化。结合来自两个不同实验的速率数据，可以得到表 4-7 所示的胞内通量。

表 4-7　从测量的速率估算杂交瘤细胞培养中的通量

10^{-10}mmol · cell^{-1} · h^{-1}

反应	实验 1	实验 2	反应	实验 1	实验 2
1	3. 180 ±0. 110	3. 910 ±0. 130	11	0. 211 ±0. 060	0. 203 ±0. 060
2	2. 850 ±0. 110	3. 540 ±0. 130	12	0. 922 ±0. 063	0. 925 ±0. 063
3	3. 030 ±0. 110	3. 740 ±0. 130	13	0. 683 ±0. 036	0. 691 ±0. 036
4	5. 960 ±0. 220	7. 380 ±0. 260	14	0. 314 ±0. 031	0. 381 ±0. 031
5	0. 315 ±0. 028	7. 000 ±0. 260	15	0. 073 ±0. 039	0. 054 ±0. 038
6	0. 315 ±0. 028	0. 355 ±0. 029	16	1. 880 ±0. 170	1. 920 ±0. 170
7	0. 178 ±0. 018	0. 202 ±0. 019	17	0. 629 ±0. 036	0. 634 ±0. 037
8	0. 089 ±0. 010	0. 101 ±0. 010	18	15. 200 ±1. 100	16. 600 ±1. 200
9	0. 089 ±0. 010	0. 101 ±0. 010	19	3. 690 ±0. 180	4. 010 ±0. 200
10	0. 090 ±0. 010	0. 101 ±0. 010	20	0. 961 ±0. 096	0. 999 ±0. 099

其中，反应 1 ~ 15 及反应 17 标注在图 4-11 中；

反应 16：$2NADH + 6ADP + O_2 \longrightarrow 2NAD^+ + 6ATP$；

反应 18：$ATP \longrightarrow ADP + Pi$；

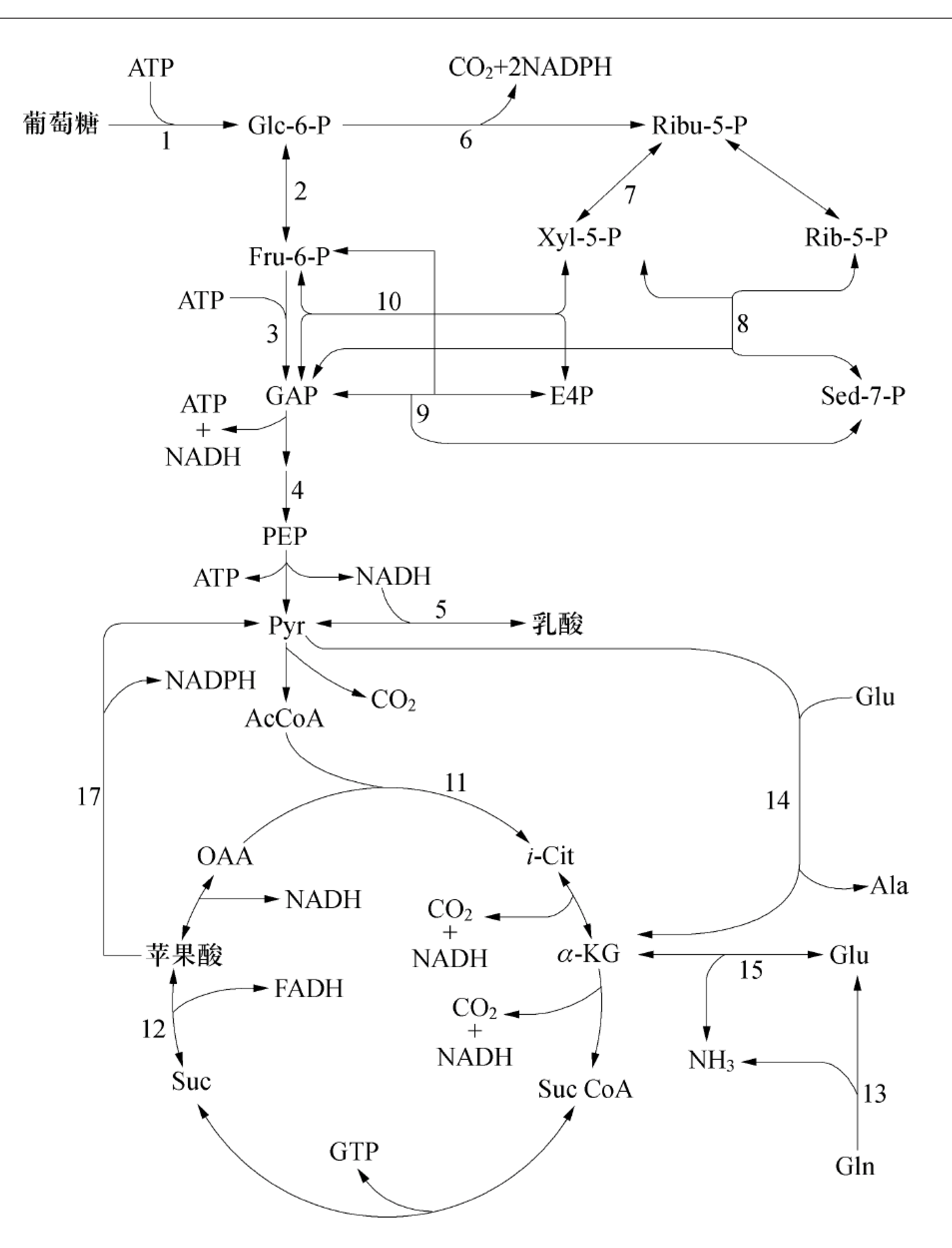


图 4-11　杂交瘤细胞中的能量代谢途径

包括糖酵解、谷氨酰胺酵解、戊糖磷酸化途径及 TCA 循环；苹果酸酶可在回补反应或丙酮酸合成中起作用。

Glc-6-P：6-磷酸葡萄糖；Ribu-5-P：5-磷酸核酮糖；Fru-6-P：6-磷酸果糖；Xyl-5-P：5-磷酸木酮糖；Rib-5-P：5-磷酸核糖；GAP：3-磷酸甘油醛；Sed-7-P：7-磷酸景天庚酮糖；Gln：谷氨酰胺

反应 19：0.036Gln + 0.062Glu + 0.0031Glc-6-P + 0.013Ribu-5-P + 0.042GAP + 123Pyr + 0.019 苹果酸 + 0.74ATP + 0.188 NADPH + 0.23NAD^+ ⟶ 生物质 + 0.072α-KG + 0.23NADH + 0.12CO_2 + 0.74ADP + 0.188$NADP^+$；

反应 20：0.012Gln + 0.07Glu + 0.04GAP + 0.011NADPH + 0.012 苹果酸 + 0.082NAD^+ ⟶ 抗体 + 0.082NADH + 0.057α-KG + 0.011$NADP^+$。

胞内通量是在不同溶氧水平上确定的，用来评价氧对细胞代谢的影响。表 4-8 总结了最重要的通量及其不确定性。丙酮酸到 TCA 循环的通量在正常溶氧水平下是显著的，但在 1% 溶氧水平时通量很小，氧限制条件下基本为零。通过丙氨酸转氨酶的通量在各种溶氧水平下基本不变。通过谷氨酸脱氢酶的通量在 60% 溶氧水平时为正，而在低溶氧水平时为负。可见，溶氧对氮代谢影响显著：低溶氧水平时，谷氨酸脱氢酶反应方向逆转，有利于谷氨酸合成。通过代谢通量分析，初步阐明胞内氧化/还原状态在细胞生理学中的基本作用，以及通过溶氧调控生理过程的可能性。

表 4-8　根据杂交瘤培养中所测胞外代谢产物变化的速率估算主要通量

mol · cell^{-1} · h^{-1}

反应/参量	通　　量		
	DO = 0	DO = 1%	DO = 60%
进入 TCA 循环的丙酮酸	0 ± 0. 3	0. 28 ± 0. 3	0. 94 ± 0. 28
丙酮酸至丙氨酸	0. 33 ± 0. 3	0. 26 ± 0. 2	0. 33 ± 0. 3
谷氨酸脱氢至 α-酮戊二酸	− 0. 29 ± 0. 3	− 0. 14 ± 0. 2	0. 4 ± 0. 3
苹果酸至丙酮酸	− 0. 24 ± 0. 3	0. 41 ± 0. 3	0. 59 ± 0. 3
总 ATP（pmol · cell^{-1} · h^{-1}）	1. 58	1. 67	1. 95

本章小结

本章主要介绍了代谢通量分析、代谢控制分析和代谢途径优化这 3 个代谢工程最核心的方法。通过代谢通量分析和代谢控制分析，可以帮助人们选定菌株定向改造的靶标，经过代谢工程改造的菌株已被广泛应用于有机酸、氨基酸、糖醇、生物燃料的生产和制药工业中。最近涌现的各种组学技术，进一步推动了代谢工程的发展，使其研究范围从局部代谢途径扩展到全局代谢网络，并能有效地提高细胞的代谢能力。

微生物代谢网络的复杂性也给代谢工程提出了很多难题，这些难题至今仍横亘在人们面前。例如，在某些网络中，为改善细胞代谢流而进行的修饰并不能完全如预期一样，有的甚至会导致整个代谢网络的崩溃。这就要求人们加深对细胞代谢网络及其调控系统的全面认识，并在此基础上使代谢工程从实验科学向模型预测甚至理论科学推进。

致谢及引申阅读

美国麻省理工大学 Gregory N. Stephanopoulos 教授为代谢工程的创始人之一，他曾与 Rice 大学 Aristos A. Aristidou 及丹麦技术大学 Jens Nielsen 教授共同编写了 *Metabolic Engineering* 一书，书中系统介绍了代谢工程研究的基本概念、原理和方法。本章在成稿过程中参考了其部分内容，特此说明，并建议感兴趣的读者仔细研读该书。

参考文献

Voit EO. 2006. 生物化学系统的计算分析. 储炬，李友荣译. 北京：化学工业出版社

张光亚，方柏山 . 2003. 代谢途径数据库简介 . 生物学通报，38 (10)：19 ~ 20

Biebl H，Menzel H，Zeng AP，et al. 1999. Microbial production of 1，3-propanediol. Applied Microbiology and Biotechnology，52：289 ~ 297

Desai R P，Harris L M. 1999. Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Metabolism Engineer，1：206 ~ 213

Lee J，Yun H，Feist A M，Palsson B O，Lee S Y. 2008. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the Clostridium acetobutylicum ATCC 824 metabolic network. Appl Microbiol Biotechnol，80：849 ~ 862

Ma H W and Zeng A P. 2003. Reconstruction of metabolic network from genome data and analysis

of their global structure for various organisms. Bioinformatics, 19: 270 ~ 277
Nissen T L, Schulze U, Nielsen J, et al. 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 143: 203 ~ 218
Stephanopoulos G, Simpson T W. 1997. Flux amplification in complex metabolic networks. Chem Eng Sci, 52: 2607 ~ 2627
Van Gulik W M, Heijnen J J. 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. Biotechnology and Bioengineer, 48: 681 ~ 698
Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. 2009. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature, 460: 894 ~ 899
Zhang Y P, Li Y, Du C Y, et al. 2006. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. Metabolism Engineer, 8 (6): 578 ~ 586
Zupke G, Sinskey A J, Stephanopoulos G. 1995. Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. Applied Microbioly Biotechnology, 44: 27 ~ 36
Zupke G, Stephanopoulos G. 1994. Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. Biotechnology Progress, 10: 489 ~ 498

习　题

1. 名词解释

（1）代谢通量；（2）代谢通量分析基本理论及其矩阵形式表示；（3）代谢控制分析；（4）通量控制系数；（5）通量控制系数加和定理；（6）浓度控制系数；（7）浓度控制系数加和定理；（8）弹性系数；（9）组通量控制系数 gFCC。

2. 根据美国专利 US2006/0148053A1，利用葡萄糖生产 1，3-丙二醇的基因工程 *E. coli* 改造了哪些基因？

3. 如果要利用 *E. coli* 将葡萄糖转化为丁醇，至少需要对哪些基因进行调控（敲除或基因表达）？

4. 假定 *Klebsiella pneumoniae* 的生长动力学可表示为：

$$\mu = \mu_m \frac{c_S}{K_S + c_S}\left(1 - \frac{c_S}{c_S^*}\right)\left(1 - \frac{c_{PDO}}{c_{PDO}^*}\right)\left(1 - \frac{c_{HAc}}{c_{HAc}^*}\right)\left(1 - \frac{c_{Eth}}{c_{Eth}^*}\right)$$

，式中，c_S、c_{PDO}、c_{HAc} 和 c_{Eth} 分别为底物甘油、产物 1, 3-丙二醇、乙酸和乙醇的浓度；K_S 是生长比速率最大值一半时的甘油浓度；c_S^*、c_{PDO}^*、c_{HAc}^* 及 c_{Eth}^* 分别为最大底物浓度和最大产物浓度。根据幂函数近似，说明哪些因素可促进生长？哪些因素抑制生长？

5. 计算已知通量存在噪声时例 4-3 的最小二乘估计。

第 5 章　微生物反应动力学

【重要概念】

群体生长、Monod 模型、生长抑制、结构模型、固态发酵、高温灭菌动力学、过滤除菌动力学

引言

在细胞水平上，通过对细胞生长、产物合成、底物消耗等的动力学特性进行定量描述，反映微生物生长、代谢的规律，为微生物反应过程优化与控制、反应过程设计研究提供依据。在生物反应计量学的基础上，本章围绕微生物过程的速率问题，通过构建模型对细胞生长、底物消耗和产物生成的定量化分析进行讨论。虽然本章内容主要是以微生物过程作为模式系统，但是其基本原理、方法、技术，可以进一步扩展到其他类型的生物或非生物反应体系。

5.1　细胞反应过程动力学模型

模型是系统变量之间关系的体现，其形式可以是文字描述、逻辑关系、数学方程等。生命科学领域的研究人员一般使用模型来解释或比较各种实验结果，在过去十几年中，生命科学实验技术取得了极大进步，特别是各种“组学”技术的发展，使得对生物反应过程模型由经验性描述逐渐发展到可以描述细胞内部详尽反应系统（详见第 4 章）。利用功能强大的计算机可以在较短时间内解决复杂的数学问题，包括复杂的描述生物反应的数学模型，并可进行模拟仿真验证。图 5-1 为建立数学模型的过程，包括验证、计算机模拟、预测、控制、实验设计、设备、过程的设计、假设再生、假设检验等，这些都会形成生物反应工程新知识，促进生物过程水平的提高。在建立细胞反应动力学模型时，首先要对细胞生长过程进行合理的简化，在简化的基础上建立过程的物理模型，再据此推导出数学模型。

数学模型的建立常从细胞水平和群体水平两个层次进行考虑。就细胞水平而言，可将模型分为非结构模型和结构模型，主要区别是是否考虑细胞内的组成结构。细胞的组分很复杂，它含有蛋白质、脂肪、糖类、核酸、维生素等，并且这些成分的含量会随着环境条件的变化而变化。如果是在考虑细胞组成变化的基础上建立的模型，则该模型称为结构模型，该模型可从机制上描述细胞的动态行为。在结构模型中，一般选取 RNA、DNA、糖类及蛋白质的含量作为过程的变量，将其表示为细胞组成的函数。但由于细胞反应过程极其复杂，加上检测手段的限制，缺乏可直接用于在线确定反应系统状态的传感器，给动力学研究带来困难，使结构模型的应用受到限制。如果将细胞视为单组分，则环境的变化对细胞组成的影响可被忽略，在此基础上建立的模型称为非结构模型。它是在实验研究的基础上，通过物料衡

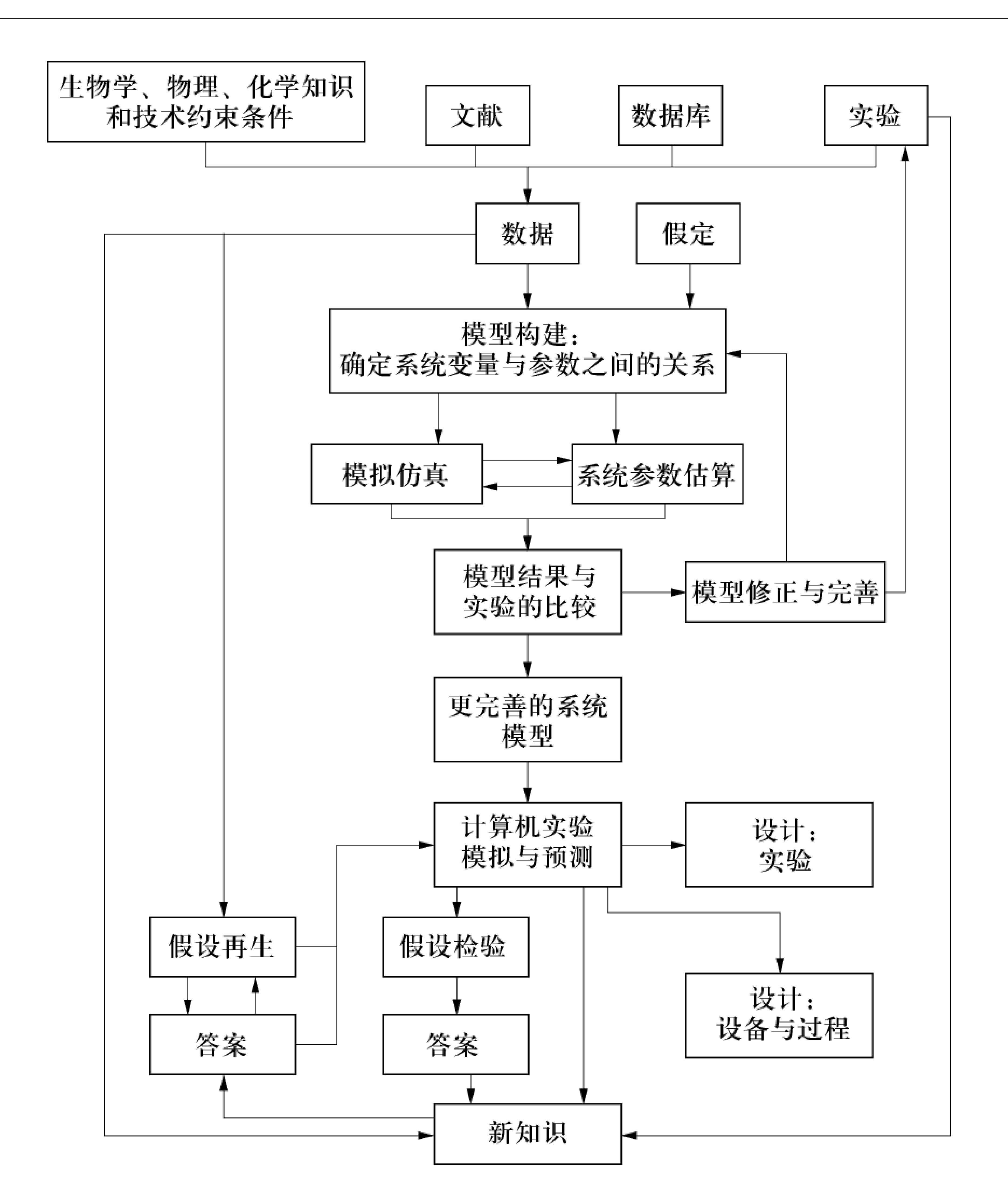


图 5-1　生物反应数学模型建立过程

算建立起来的经验或半经验的关联模型。在细胞的生长过程中，如果细胞内各种成分均以相同的比例增加，则称为均衡生长；如果由于各组分的合成速率不同而使各组分增加的比例也不同，则称为非均衡生长。从模型简化的角度考虑，一般采用均衡生长的非结构模型。非结构模型可视为细胞生长反应动力学模型最大程度的简化。

就群体水平而言，可将模型分为非分离（确定论）模型和分离（概率论）模型，主要需要考虑细胞个体之间、相间是否存在差异。一般而言，细胞生长处于不同状态，个体之间就会存在一定差异，或是刚分裂的，或是刚出芽分离的。同时，细胞是细胞壁包围的个体，与所生存环境之间需要进行物质交换，这样就存在两相问题。如果考虑每个细胞之间的差别，并将细胞作为与培养液分离的生物相处理，则建立的模型称为分离（概率论）模型。不考虑细胞之间的差别，取其性质的平均值，也不考虑细胞与培养液之间的相问题，将细胞和培养液视为单一相——液相，在此基础上建立的模型称为非分离（确定论）模型。目前多应用非分离（确定论）模型。

根据模型中所包括的细节水平，图 5-2 将描述发酵过程的模型大体上分成 4 类，其中 A 为非分离非结构模型，B 为非分离结构模型，C 为分离非结构模型，D 为分离结构模型。最简单的模型是所谓的非结构模型，生物量由单一变量描述（常是总的生物量浓度），其中不考虑细胞群体的分离。当考虑细胞群体的分离时，常将更多的结构加入到模型中。在所谓的结构模型中，可用多个变量来描述生物量，即考虑生物量的结构。很显然，限定模型的结构（或指定模型的复杂性）是生物反应过程数学建模的一个极为重要的原则。一个普遍认可的

规则是：越简单越好，只要模型中包括基本的机制及模型结构即可。

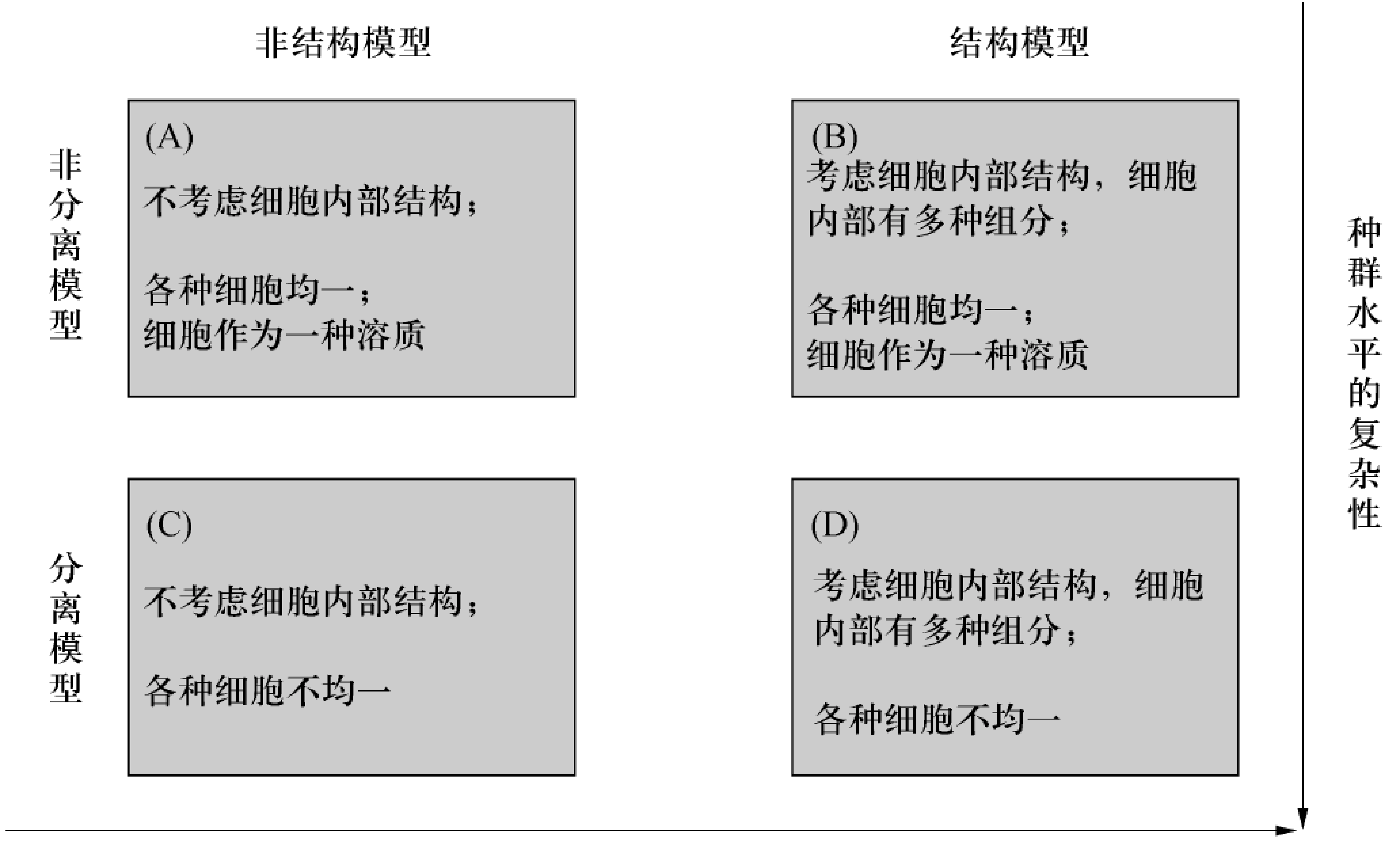


图 5-2　细胞反应过程动力学模型分类示意图

生物反应过程本身是极其复杂的。细胞生长及代谢产物的生成是胞内大量反应的综合体现。如基因表达、mRNA 转译为功能蛋白、蛋白质进一步成为功能性的酶或结构蛋白、产生用于合成细胞组分的中间代谢产物等一系列的生化反应（图 5-3），显然，用一个数学模型

图 5-3　*Streptococcus*. *mutans* 中部分代谢途径和转运机制

完整地描述全部细胞的生物反应十分困难。但随着基因组学等各种“组学”技术的发展，人们已经可以在基因组规模上模拟细胞内部的各个反应，如“e-cell”，这为人们采用数学模型揭示细胞反应规律提供了必要的手段。在生物反应过程中存在大量的细胞，细胞活性及功能的非均一性进一步增加了过程的复杂性。对大量的细胞反应建立发酵模型时，模型中应考虑的问题（如数量度）取决于建模目的。

5.2　微生物生长非结构模型

5.2.1　细胞生长过程的速率与比速率

1. 细胞生长的速率、比速率（μ）　与酶反应速率一样，细胞生长速率可表示为单位时间、单位反应体积内的细胞的变化量，用 r_X 表示，如下式所示：

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} \tag{5-1}$$

式中，r_X为细胞生长速率（$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）；$c_X$ 为用干重表示的细胞浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

生理学对生长比速率（specific growth rate）的解释多有分歧，如解释为指数增长率、单个菌体的生长速度、生长速度常数、单位时间的分裂次数（分率）等。在生化工程学中，将 μ 定义为单位量的菌体的瞬时增量：

$$\mu = \frac{1}{N}\frac{dN}{dt} \tag{5-2}$$

$$\mu = \frac{1}{c_X}\frac{dc_X}{dt} \tag{5-3}$$

式（5-2）和式（5-3）中，N 表示微生物群体细胞质量或个数，c_X 表示细胞的浓度，$\frac{dc_X}{dt}$、$\frac{dN}{dt}$代表群体质量或个数的瞬时增量。μ 表示以单位细胞浓度为基础的细胞增殖速率，由于这一生长比速率定义的生理意义十分明确，也就成为生化工程学上广为采用的定义。如果生物量 N 以 g 为单位，t 以小时（h）为单位，μ 即为每克菌体在 1h 内菌体质量增加的克数，μ 的单位为 h^{-1}。一般情况下，细胞生长的μ 并非常数，遗传因素是μ 大小的决定因素，细胞包含的遗传信息越复杂，越是高等生物，μ 越小，同时 μ 取决于菌株、培养温度、底物浓度等因素。

2. 底物消耗比速率　底物的消耗通常用底物消耗比速率（specific substrate consumption rate）来表示，即单位质量菌体在单位时间内的底物消耗量。用 q_S 表示，单位为 $g \cdot g \cdot h^{-1}$。

$$q_S = \frac{r_S}{c_X} = \frac{1}{c_X}\frac{dc_S}{dt} \tag{5-4}$$

式中：c_S 为底物浓度；$\frac{dc_S}{dt}$即为底物的消耗速率 r_S。

通过菌体得率系数可以将 q_S 与 μ 相关联，根据式（5-3）和式（5-4）可得：

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \tag{5-5}$$

3. 代谢产物生成比速率　与细胞生长、底物消耗类似，代谢产物的生成也可用速率、比速率来量化。速率一般是以体积为基准，即单位体积内产物量的变化率，用 r_P 表示，与

细胞浓度有关，是反应器设计的重要参数。比速率是单位质量菌体在单位时间内的代谢产物的生成量，用 q_P 表示，单位为 $g \cdot g \cdot h^{-1}$，与菌体浓度无关，表示细胞合成代谢产物的能力，在菌种筛选时可以作为一个重要的参考指标。

$$q_P = \frac{r_P}{c_X} = \frac{1}{c_X}\frac{dc_P}{dt} \tag{5-6}$$

也可以通过产物得率系数将 q_P 与 q_S、μ 相关联，根据式（5-4）、式（5-5）和式（5-6）可得：

$$q_P = Y_{P/S} \cdot q_S = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}\mu \tag{5-7}$$

将生化工程中表征细胞反应过程常用的速率、比速率列于表 5-1 中。

表 5-1　生化反应工程中细胞反应过程常用的速率、比速率

项目	速率	编号	比速率	编号
细胞生长	$r_X = \frac{dc_X}{dt}$	（5-1）	$\mu = \frac{1}{c_X}\frac{dc_X}{dt}$	（5-2）
底物消耗	$r_S = \frac{dc_S}{dt}$	（5-8）	$q_S = -\frac{1}{c_X}\frac{dc_S}{dt}$	（5-4）
氧消耗	$r_{O_2} = \frac{dc_{O_2}}{dt}$	（5-9）	$q_{O_2} = -\frac{1}{c_X}\frac{dc_{O_2}}{dt}$	（5-10）
产物生成	$r_P = \frac{dc_P}{dt}$	（5-11）	$q_P = -\frac{1}{c_X}\frac{dc_P}{dt}$	（5-12）
CO_2 生成	$r_{CO_2} = \frac{dc_{CO_2}}{dt}$	（5-13）	$q_{CO_2} = -\frac{1}{c_X}\frac{dc_{CO_2}}{dt}$	（5-14）
热量生成	$r_{H_v} = \frac{dH_v}{dt}$	（5-15）	$q_{H_v} = -\frac{1}{c_X}\frac{dH_v}{dt}$	（5-16）

5.2.2　微生物生长动力学

1. 细胞的群体生长　菌种接种到液体培养基后，微生物有选择性地吸收营养，转化成细胞。在封闭系统中对微生物进行的培养，既不补充营养物质也不移去培养物质，保持整个培养液体积不变的培养方式称为分批培养（batch culture）。细胞自从接种后所经历的时间称为菌龄（cell age），以时间为横坐标，以菌数为纵坐标，根据不同培养时间里细菌数量的变化，可以做出一条反映细菌在整个培养期间菌数变化规律的曲线，这条曲线称为生长曲线（growth curve）。一条典型的分批培养的生长曲线可以分为迟滞期、对数生长期、减速生长期、稳定生长期和衰亡期 5 个生长时期，如图 5-4 所示。

1）迟滞期（lag phase）：菌种接入新的环境中即进入迟滞期。细菌接种到新鲜培养基而处于一个新的生长环境，需要合成新的酶系吸收营养，并对新环境作出应答，调整胞内运行机制。因此在一段时间里并不马上分裂，细菌的数量维持恒定，或增加很少。此时胞内的 RNA、蛋白质等物质含量有所增加，细胞体积相对最大，说明细菌并不是处于完全静止的状态。种龄（age of the inoculum culture）对迟滞期的长短有很大影响。种龄即为接种微生物的培养时间。一般来说，存在一个最佳种龄，此时细胞比较年轻，活力旺盛（或对数生长

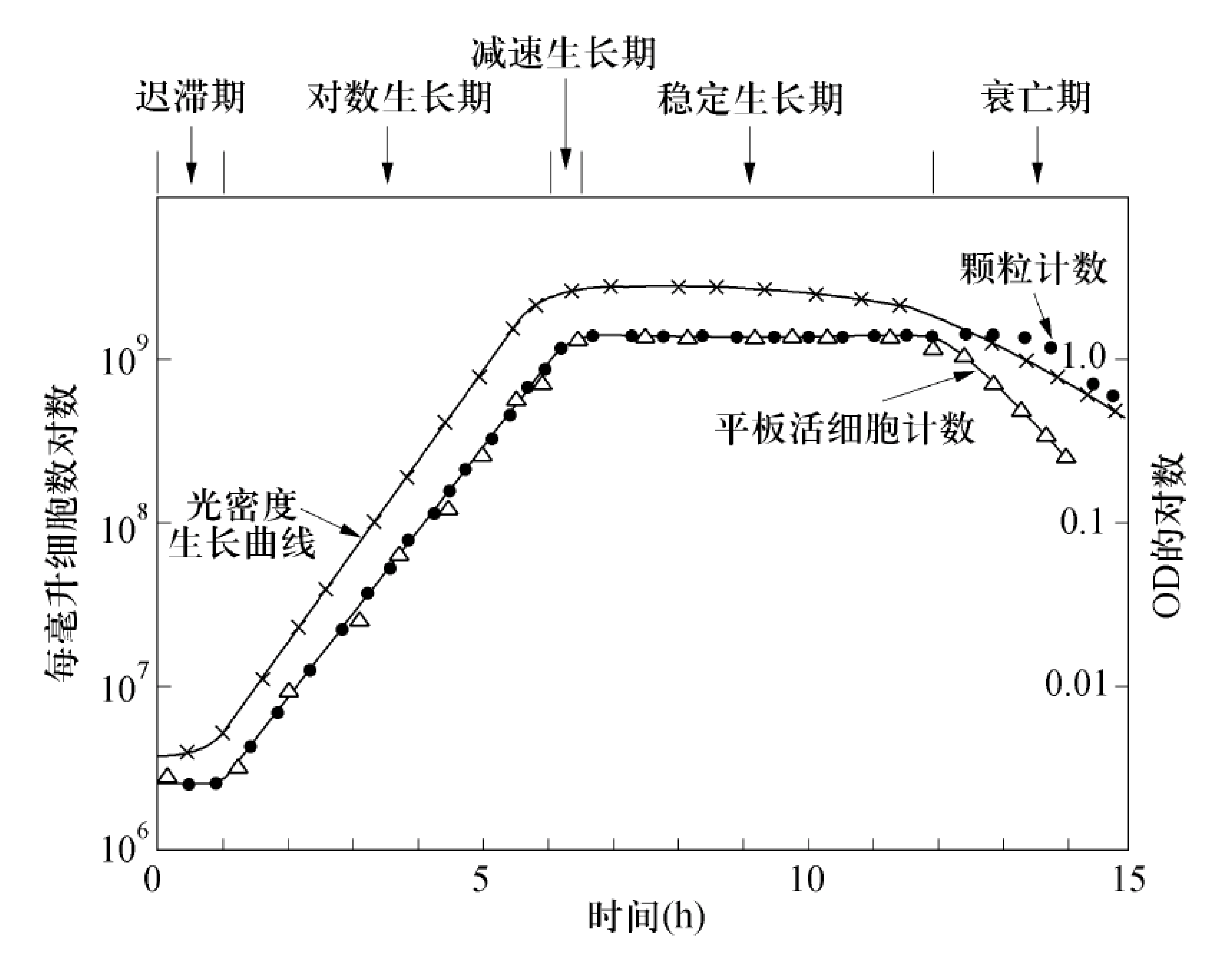


图 5-4　典型的分批培养过程曲线

期），接种体积比较大（5%～15%）。

不同的微生物，甚至同一种微生物对不同物质的利用能力是不同的。有的物质可直接被利用（如葡萄糖或 NH_4^+ 等）；有的物质需要微生物经过一定的适应期后才能获得利用能力（如乳糖或 NO_3^- 等）。前者通常称为速效碳源（或氮源），后者称为迟效碳源（或氮源）。微生物在同时含有速效碳源（或氮源）和迟效碳源（或氮源）的培养基中生长时，微生物首先会利用前者生长直到耗尽速效碳源，然后经过短暂的停滞后，再利用迟效碳源重新开始生长，这种生长或应答称为二次生长（diauxic growth），如图 5-5 所示。速效底物通常会抑制利用其他底物的酶合成，当速效底物完全消耗后，细胞调节代谢机制，适应第 2 种底物。当培养基中存在多种可利用的底物时，可以观察到多个迟滞期的现象。

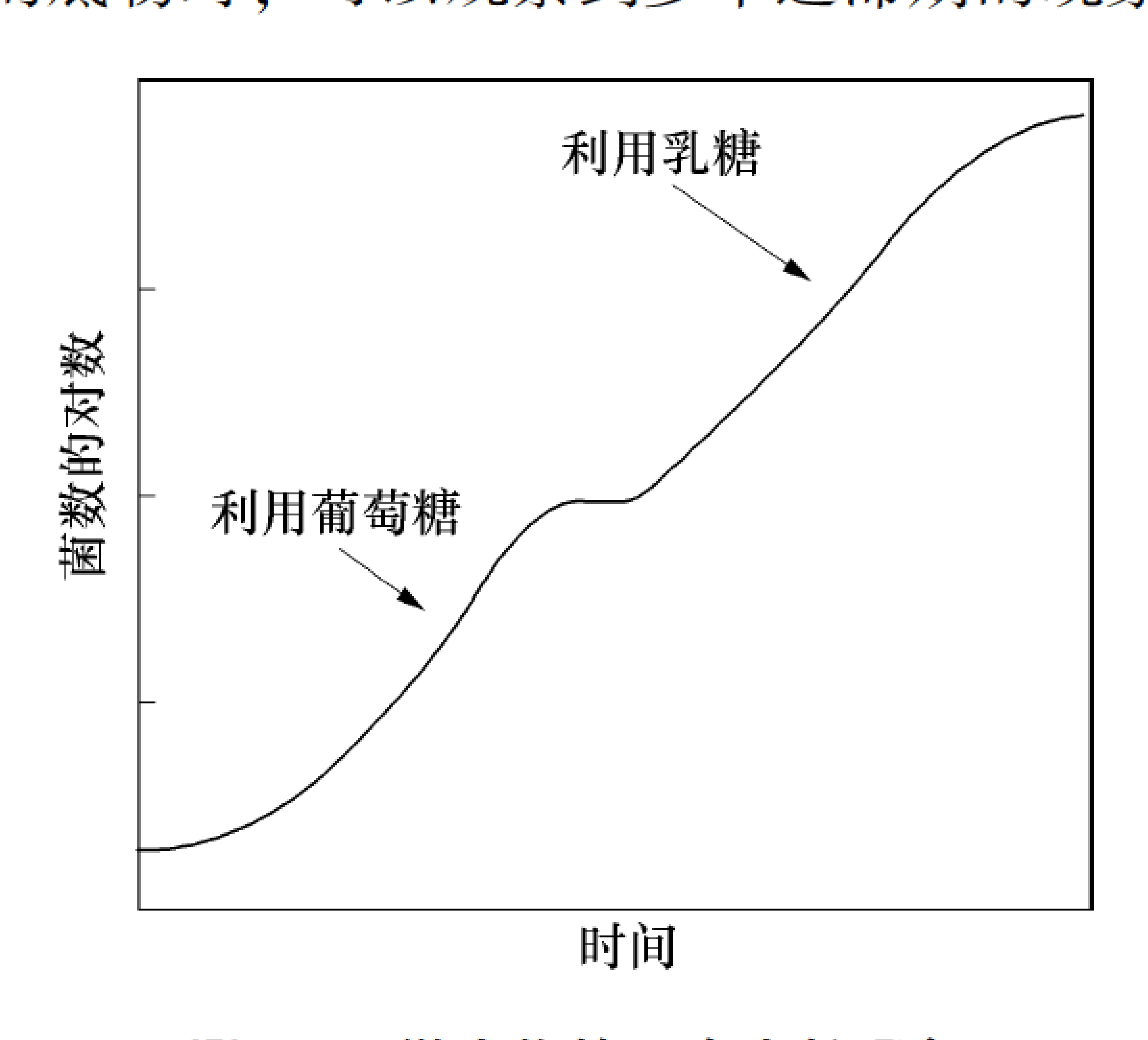


图 5-5　微生物的二次生长现象

2）对数生长期（log phase）：又称指数生长期（exponential phase）。细菌经过迟滞期进入对数生长期，并以最大的速率生长和分裂，导致细菌数量呈对数增加，此时细菌呈均衡生长（balance growth），即细胞内各成分按比例有规律地增加，所有细胞组分呈彼此相对稳定速度合成。对数生长期细菌的代谢活性及酶活力高而稳定，细胞大小比较一致，活力强，在生产上，它常被广泛地用作“种子”。在均衡生长阶段，营养物质浓度较大，细胞生长速率

与营养物质浓度无关，符合一级动力学。

$$r_X = \frac{dc_X}{dt}\mu_m c_X \tag{5-17}$$

式中，μ_m 是最大生长比速率（h^{-1}）。

当 $t = t_0$ 时，$c_X = c_{X_0}$，

由式（5-16）积分得：

$$ln\frac{c_X}{c_{X_0}} = \mu_m t \tag{5-18}$$

或：

$$c_X = c_{X_0}e^{\mu_m t} \tag{5-19}$$

式中：c_X、c_{X_0}为 t、t_0 时刻的细胞浓度；μ_m 为对数生长期内的细胞生长比速率。

在生化工程学中，倍增时间（doubling time）是另一个表示细胞生长快慢的概念。定义为细胞数量（质量）增大 1 倍所需要的时间，用 t_d 表示，倍增时间约等于世代时间（generation time）。根据 μ 的定义，t_d 与 μ 之间的关系如下：

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0.693}{t_d} \tag{5-20}$$

表 5-2 表示几种微生物的世代时间，大体上，细菌的世代时间为几十分钟到几个小时，藻类为几个小时到几天，霉菌为几个小时到几十个小时。

表 5-2　部分微生物的世代时间

微生物	温度（℃）	世代时间（h）
细菌		
Beneckea natriegens	37	0. 16
Escherichia coli	40	0. 35
Bacillus subtilis	40	0. 43
Staphylococcus aureus	37	0. 47
Pseudomonas aeruginosa	37	0. 58
Clostridium botulinum	37	0. 58
Rhodospirillum rubrum	25	4. 6 ~ 5. 3
Anabaena cylindrica	25	10. 6
Mycobacterium tuberculosis	37	≈12
Treponema pallidum	37	33
藻类		
Scenedesmus quadricauda	25	5. 9
Chlorella pyrenoidosa	25	7. 75
Asterionella formosa	20	9. 6
Euglena gracilis	25	10. 9
Ceratium tripos	20	82. 8
原生动物		
Tetrahymena geleii	24	2. 2 ~ 4. 2
Leishmanla donovani	26	10 ~ 12
Paramecium caudatum	26	10. 4
Acanthamocba castellanii	30	11 ~ 12
Gianlia lamblia	37	18

续表

微生物	温度（℃）	世代时间（h）
真菌		
Saccharomyces cerevisiae	30	2
Monilinia fraa	25	30

3）减速生长期（deceleration phase）：是由对数生长期到稳定生长期的过渡。是由于一种或多种营养物质的完全消耗或是由于有害产物的积累导致的。在典型的细菌分批培养过程中，这个阶段时间很短。环境的迅速变化导致了不平衡生长，对细胞形成压力，细胞组成和大小发生变化，倍增时间延长。

4）稳定生长期（stationary phase）：由于营养物质消耗、代谢产物积累和 pH 等环境变化，环境条件逐步不适宜细菌生长，导致细菌生长速率降低直至零（即细菌分裂增加的数量等于细菌死亡数量），从而结束对数生长期，进入稳定生长期。稳定生长期中与细胞生长相关的产物即初级代谢产物减少，而与非生长相关代谢产物即次级代谢产物开始产生（如抗生素等）。稳定生长期的活细菌数最高并维持稳定。补充营养物质或取走代谢产物或改善培养条件，如对好氧菌进行通气、搅拌或振荡等可以延长稳定生长期，获得更多的菌体物质或代谢产物。对于减速生长期以及稳定生长期，微生物生长动力学方程可表示为

$$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = (\mu - k_d)\ c_X \tag{5-21}$$

式中：c_X 是衰亡期开始时的菌体质量浓度；k_d 是菌体死亡速率常数。

5）衰亡期（decline 或 death phase）：营养物质耗尽和有毒代谢产物的大量积累，细菌死亡速率逐步增加和活细菌逐步减少，标志细菌的群体生长进入衰亡期。该时期细菌代谢活性降低，细菌衰老并出现自溶。该时期死亡的细菌以对数方式增加，但在衰亡期的后期，由于部分细菌产生抗性也会使细菌死亡的速率降低。

菌体的死亡也遵循一级反应动力学：

$$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = -k_d c_X \tag{5-22}$$

式中：c_X 是衰亡期开始时的菌体浓度；k_d 是菌体死亡速率常数。

上述生长阶段的动力学方程汇总于表 5-3。

表 5-3　分批培养过程各阶段的动力学特征

生长阶段	生长速率	生长比速率
迟滞期	$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t}=0$ $c_X = c_{X_0}$	$\mu = 0$
对数生长期	$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t}=\mu_m c_X$ $c_X = c_{X_0}\exp(\mu_m t)$ $t_d = \frac{\ln 2}{\mu_m}$	$\mu \approx \mu_m$

续表

生长阶段	生长速率	生长比速率
减速生长期	$\frac{dc_X}{dt}=\mu c_X$ $c_X=c_{X_0}\exp(\mu t)$	$\mu<\mu_m$
稳定生长期	$\frac{dc_X}{dt}=(\mu-k_d)c_X$	$\mu<\mu_m$
衰亡期	$\frac{dc_X}{dt}=-k_d c_X$	$\mu=0$

注：初始浓度均为各阶段起始时浓度。

2. 无抑制微生物生长动力学

1）Monod 模型：除少数真菌外，微生物从接种开始就进行群体繁殖生长。在一定温度和 pH 条件以及特定的培养基中，群体生长的微生物针对一种特定的限制性营养组分，存在：

$$\mu=f(c_S) \tag{5-23}$$

作为 $f(c_S)$ 的表达式，最著名的是 1942 年 Monod 提出的双曲线经验式（Monod 方程）：

$$\mu=\frac{\mu_m c_S}{K_S+c_S} \tag{5-24}$$

式中：μ 表示生长比速率（h^{-1}）；μ_m 表示最大生长比速率（h^{-1}）；c_S 表示限制性底物浓度（$g\cdot L^{-1}$）；K_S 表示饱和常数（$g\cdot L^{-1}$），其值等于生长比速率为最大生长比速率一半时的底物浓度。表 5-4 列出了部分微生物生长时的 K_S。根据式（5-24）作图，可得到如图 5-6 所示的生长比速率与底物浓度的关系图。

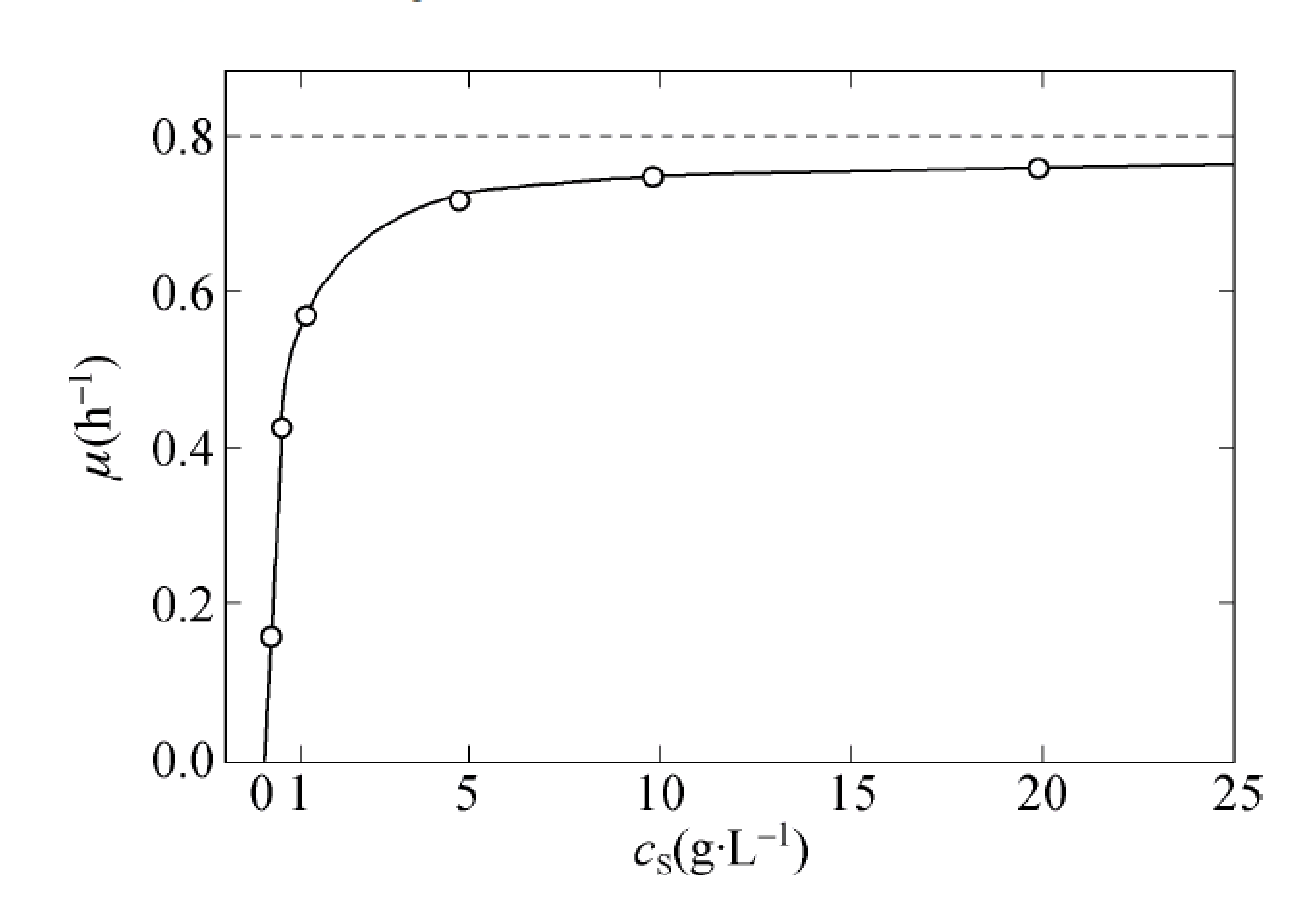


图 5-6　Monod 模型中生长过程的底物与生长比速率关系

Monod 模型描述的是一种典型的均衡生长，其基本假设如下：①菌体生长为均衡生长，细胞中各种组分比例不变，采用一个参数即菌体浓度即可表示细胞变化的总体情况；②生长限制性底物（growth-limited substrate）只是培养基中的一种组分，其他营养组分含量不会影响细胞生长；③细胞利用基质的效率不变，即细胞生长是简单反应，菌体的得率系数不变。符合这 3 个条件的培养系统的为简单 Monod 培养系统。

表 5-4　在不同的碳源上生长的几种微生物细胞的 K_S 值

菌种	底物	K_S（$mg \cdot L^{-1}$）
Aspergillus oryzae	葡萄糖	5
Escherichia coli	葡萄糖	4
Klebsiella pneumoniae	葡萄糖	9
Aerobacter aerogenes	甘油	10
Klebsiella oxytoca	葡萄糖	10
Penicillium chrysogenum	葡萄糖	4
Saccharomyces cerevisiae	葡萄糖	180

Monod 方程虽然在形式上和米氏方程相似，但前者却是一个半经验模型，是细胞群体生命活动的综合表现，很难像米氏方程的 K_M 那样明确方程中的 K_S 的含义，但可以采用酶反应的基本原理对该方程进行一些说明。假定培养基的多种底物中有一种是限制性底物，该底物被微生物利用时所需要的酶系统进行催化时是符合米氏方程的，酶的量（细胞量）或其活力足够低，从而限制细胞的生长速率（比速率）。

2）Monod 方程的特例：对 Monod 方程进行分析，可以发现当限制性底物浓度很低时，$c_S \ll K_S$，微生物细胞的生长比速率与限制性底物浓度 c_S 成正比，即符合一级反应动力学。

$$\mu \approx \frac{\mu_m}{K_S} c_S \tag{5-25}$$

当限制性底物浓度很高时，$c_S \gg K_S$，微生物细胞的生长比速率不再随着限制性底物浓度的提高而变化，此时细胞生长比速率达到最大值，$\mu \approx \mu_m$，与限制性底物浓度 c_S 无关，即符合一级反应动力学。

当限制性底物浓度介于两者之间时，则 μ 与 c_S 关系符合 Monod 方程，根据式（5-1）和式（5-24）有：

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu c_X = \frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S} c_S \tag{5-26}$$

3）其他无抑制细胞生长动力学方程：Monod 方程表述简单，是最重要的细胞生长动力学方程，至今仍被广泛使用。但是 Monod 方程仅适用于细胞生长较慢和细胞密度较低的环境下，因为只有这时，细胞的生长才能与底物浓度呈简单关系。如果底物消耗速率过快或细胞密度过高，可能产生较大量的有害副产物，下列方程常被用来描述快速生长细胞的动力学：

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_{S_0} c_{S_0} + c_S} \tag{5-27}$$

或

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_{S_1} K_{S_0} c_{S_0} + c_S} \tag{5-28}$$

式中：c_{S_0} 为初始限制性底物浓度；K_{S_0} 为无因次常数。

根据 μ-c_S 曲线的形状，可以选用更合适的模型来模拟反应过程。表 5-5 为其他几种微生物比生长动力学表达式。除了 Moser 模型外，所有的动力学表达式如 Monod 模型均含有两个

可调整的参数。Blackman 模型可以比较好地拟合实验数据，但是由于方程的不连续性使其应用比较麻烦。在 Contois 动力学模型中，包括了生物量浓度 c_X 的影响，即在高的生物量浓度时存在对细胞生长的抑制作用，生物量浓度本身不可能抑制细胞生长，但可能有一些间接的作用，如细胞产生了抑制性化合物，或者高的生物量浓度可能非常黏稠，引起传递问题。类似的，Logistic law 模型表达了生物量浓度对生长比速率的限制作用。这些不同的表达式是对细胞生长动力学模型的经验描述，因此不能说哪一种模型更好，因为它们都是简单的数据拟合方程，在具体的发酵过程中应该选用能最好地描述所研究微生物系统的模型。

表 5-5　几种常用的非结构动力学模型

模型名称	动力学表达式	编号	特　　点
Monod 模型	$\mu=\dfrac{\mu_m c_S}{K_S+c_S}$	(5-29)	底物吸收步骤为限速步骤
Blackman 模型	$\mu\begin{cases}\mu_{max}\dfrac{c_S}{2K_S}; & 当\ c_S\leqslant 2K_S\\ \mu_{max}; & 当\ c_S\geqslant 2K_S\end{cases}$	(5-30)	除底物吸收步骤为限速步骤外，另有一限速步骤
Tessier 模型	$\mu=\mu_{max}(1-e^{-c_S/K_S})$	(5-31)	经验方程
Moser 模型	$\mu=\mu_{max}\dfrac{c_S^n}{c_S^n+K_S c_X}$	(5-32)	底物吸收对速率的幂次生长产生影响，如气相底物
Contois 模型	$\mu=\mu_{max}\dfrac{c_S}{c_S+K_S c_X}$	(5-33)	细胞外有扩散现象
Logistic law 模型	$\mu=\mu_{max}\left(1-\dfrac{c_X}{K_X}\right)$	(5-34)	生物量对细胞生长有抑制作用
Mason 和 millis 模型	$\mu=\mu_{max}\left(\dfrac{c_S}{c_S+K_S}+K_i c_S\right)$	(5-35)	底物吸收、传递、扩散，同时影响生长
Vavilin 模型	$\mu=\mu_{max}\dfrac{c_S^n}{K_S^{n-m}c_{S(t=0)}^m+c_S^n}$	(5-36)	考虑有害底物的 Moser 方程

3. 有抑制的微生物生长动力学　在高底物、产物浓度情况下或培养基中出现抑制性物质时，细胞生长会受到抑制，其生长比速率会下降。这些抑制剂的存在或是改变了细胞的渗透性，或是影响了酶的合成、酶的活力等。图 5-7 为典型的有抑制的微生物生长动力学曲线。

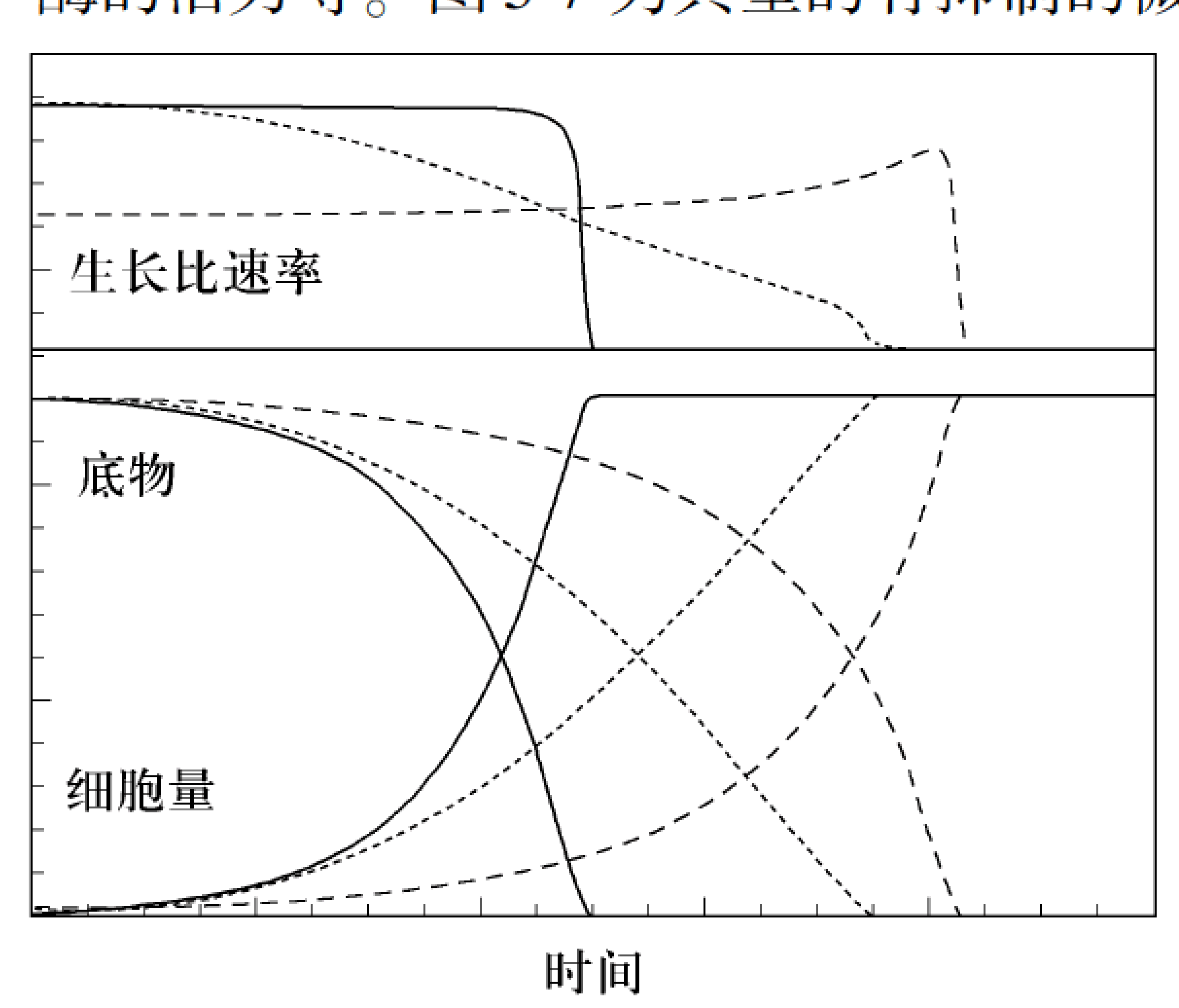


图 5-7　有抑制的微生物生长动力学曲线

—— Monod　- - - - 底物抑制　········ 产物抑制

1）底物抑制微生物生长动力学：如同酶反应动力学一样，底物对生长的抑制可分为竞争性抑制和非竞争性抑制。在细胞生长过程中，如果细胞内单底物的酶催化反应是影响生长速率的限制步骤，那么细胞生长的抑制和酶反应的抑制具有相同模式。

竞争性抑制时，微生物生长动力学符合：

$$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right) + c_S} \tag{5-37}$$

非竞争抑制时，微生物生长动力学符合：

$$\mu = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{K_S}{c_S}\right)\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right)} \tag{5-38}$$

如果 $K_I \gg K_S$，则：

$$\mu = \frac{\mu_m c_S}{c_S^2/K_I + c_S + K_S} \tag{5-39}$$

表 5-6 中还列出了其他的底物抑制动力学模型。

表 5-6　底物抑制微生物生长动力学模型

模型名称	动力学表达式	编号	特　性
Haldane 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right) + c_S}$	（5-40）	反竞争抑制
Ierusalimsky 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S}{k_S + c_S} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right)}$	（5-41）	非竞争抑制
Aiba 和 Edwards 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S} e^{-\frac{c_S}{K_I}}$	（5-42）	
Yano 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S\left[1 + \sum_{i=1}^{N}\left(\frac{c_S}{K_{Ii}}\right)^i\right]}$	（5-43）	反竞争抑制通式
Teissier 模型	$\mu = \mu_m\left(e^{-\frac{c_S}{K_I}} - e^{-K_S c_S}\right)$	（5-44）	
Webb 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right)}{K_S + c_S\left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right)}$	（5-45）	
Hill 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S^N}{K_S^N + c_S^N}$	（5-46）	变构抑制
Wayman 和 Tseng 模型	$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S} - K_I \min\left(c_{S_I} - c_{S_0}\right)$	（5-47）	有害物质抑制
Chen 模型	$\mu = \left(1 + \frac{c_S}{K_I}\right)\frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S - \left(K_{S_2} c_S\right)^2}$	（5-48）	有害物质抑制

续表

模型名称	动力学表达式	编号	特　性
Tan 模型	$\mu=\dfrac{\mu_m\sum_{i=1}^{N}\left(\dfrac{c_S}{K_{Ii}}\right)^i}{K_S+\sum_{i=1}^{N}\left(\dfrac{c_S}{K_{Ii}}\right)^i}$	(5-49)	

2）产物抑制细胞生长动力学：产物对细胞生长的抑制也可分为竞争性抑制和非竞争性抑制。以下为一些重要的产物抑制动力学方程。

竞争性抑制：

$$\mu=\frac{\mu_m c_S K_S}{\left(1+\dfrac{c_P}{K_P}\right)+c_S} \tag{5-50}$$

非竞争性抑制：

$$\mu=\frac{\mu_m}{\left(1+\dfrac{K_S}{c_S}\right)\left(1+\dfrac{c_P}{K_P}\right)} \tag{5-51}$$

一定浓度的乙醇将会抑制细胞的生长代谢，图 5-8 为乙醇抑制酵母细胞生长时可能的作用部位，酵母利用葡萄糖生产乙醇是一个典型的产物抑制过程，乙醇浓度高于 5% 时就会有明显的抑制作用，其动力学还可用以下模型来描述：

$$\mu=\frac{\mu_m}{\left(1+\dfrac{K_S}{c_S}\right)}\left(1-\frac{c_P}{c_{P_m}}\right) \tag{5-52}$$

式中，c_{P_m} 是最终产物浓度。

或：

$$\mu=\frac{\mu_m}{\left(1+\dfrac{K_S}{c_S}\right)}e^{-\frac{c_P}{K_P}} \tag{5-53}$$

式中，K_P 是产物抑制常数。

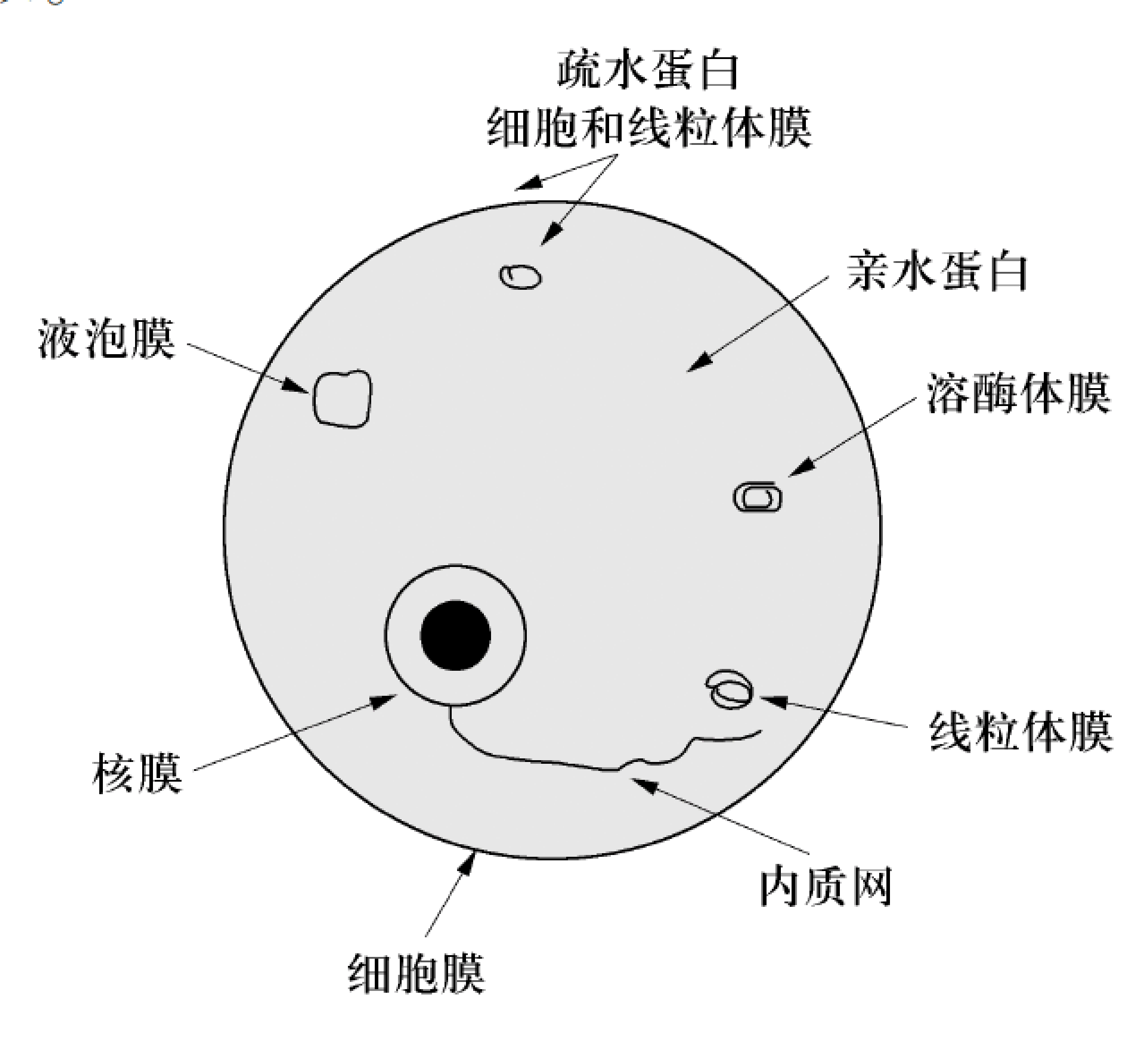


图 5-8　乙醇抑制酵母细胞生长时可能的作用部位

3）有害物质抑制的细胞生长动力学：与酶反应一样，有害物质对细胞生长的抑制可分为竞争抑制、非竞争抑制和反竞争抑制 3 种类型，可以用类似酶反应抑制动力学公式来表示。在某些情况下，有害物质的出现可能导致细胞生长停止或死亡，出现死亡时的净生长比速率可表示为：

$$\mu = \frac{\mu_m c_S}{c_S + K_S} - k'_d \tag{5-54}$$

式中，k'_d为死亡速率常数。

5.2.3　多底物培养动力学模型

表 5-5 中的动力学表达式均假定仅存在一种限制性底物，但对于实际的生物过程（如废水生物处理过程），微生物在含多种碳源的复合培养基中生长，经常会有几种底物浓度影响微生物的生长，因此不能用简单模型方程来描述。微生物在多底物的培养基中生长时，微生物必须先合成相应的酶，其生长速率因此会受到影响。图 5-9 描述了双底物反应的动力学曲线，可区分为依次利用、同时利用和两者交叉过渡的几种情形。

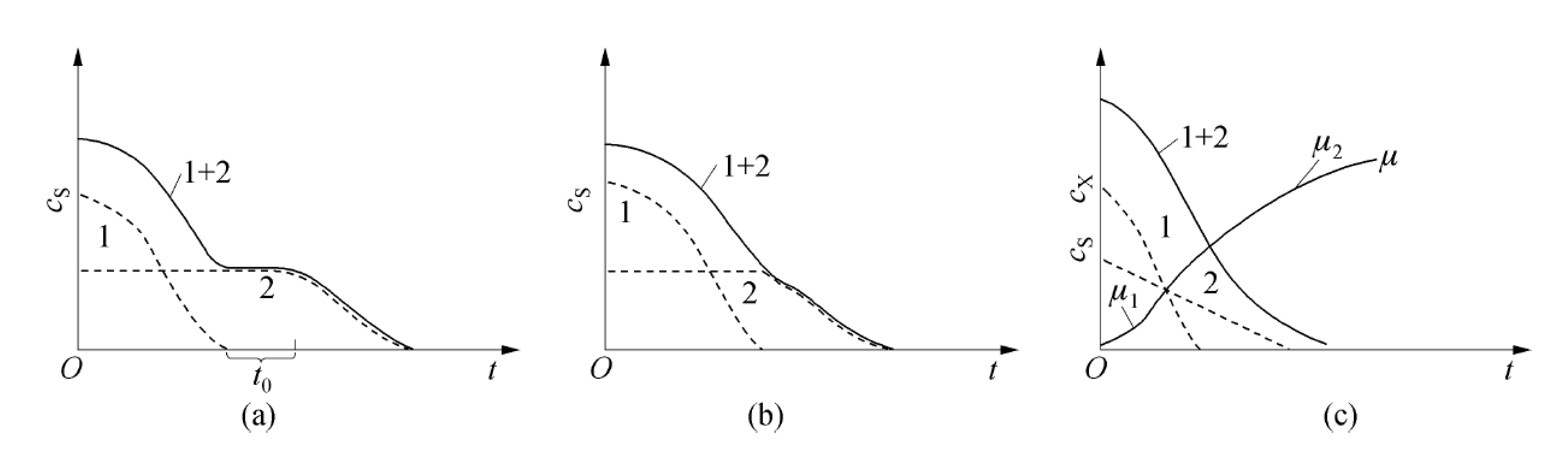


图 5-9　双底物反应的动力学过程

（a）底物严格依次利用（二次生长）；（b）底物部分交叉利用；（c）底物同时利用

1、2 代表两种底物

1. 多底物依次利用时的细胞生长动力学　对于底物依次利用的情况，在整个过程中将会出现一系列生长期，每个生长期的生长速率都会逐步下降，一般来说，容易利用的底物在短时间内先被耗尽。底物依次利用的一般化方程可用下列关系式来表示：

$$\mu = \mu(c_{S_1}) + \mu(c_{S_2}) \cdot f_r(c_{S_1}, t) \tag{5-55}$$

式中，f_r 是只要培养基中还存在 c_{S_1}时，c_{S_2}的利用就受到分解代谢阻遏控制的一个调节因子。对于遵循式（5-55）的二次生长，Imanaka 和 Moser 分别提出了一个相似的方程，用简单关系

$$f_r(c_{S_1}) = \frac{c_{S_2}}{c_{S_1} + c_{S_2}} \tag{5-56}$$

及

$$f_r(c_{S_1}) = \frac{1}{1 + c_S/K_R} \tag{5-57}$$

来表示调节作用。K_R 为分解代谢阻遏常数。

在啤酒酿造工艺中，葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖依次被利用。研究人员曾用一个简单的糖利用动力学模型来描述啤酒酵母在发酵过程中对麦芽汁的利用情况，其中使用了一个临界

浓度的概念。这个临界浓度可被看做从利用第一种限制性底物到利用第二种限制性底物的启动开关。在一个时期内，依次利用现象基本上仅采用一种限制性底物，用一个带有附加项的方程来表示式（5-55），有时，最终的方程也会出现许多项。

Moser 在带有部分交叉利用的双底物动力学中使用了另一个临界底物浓度的概念。这个浓度可以直接测量。$c_{S_{1,crit}}$ 值是短时间内 c_{S_1} 和 c_{S_2} 同时利用的浓度，因此下式：

$$f_1 = \frac{1}{1 + c_{S_1}/c_{S_{1,crit}}} \tag{5-58}$$

可用于代替式（5-55）的 f_r。

2. 同时利用多底物时的细胞生长动力学　对于两种底物 c_{S_1} 和 c_{S_2} 均可能限制微生物的生长情况，根据它们对生长速率的影响分为不同类型：互补型，如葡萄糖和 NH_3，葡萄糖和 O_2；部分互补型，如动物细胞培养时的葡萄糖和谷氨酰胺；替代型，如葡萄糖和麦芽糖；不对等替代型，c_{S_2} 完全替代 c_{S_1}，而 c_{S_1} 只能部分替代 c_{S_2}，如氨基酸和葡萄糖。

对于互补型双底物限制的生长过程，生长比速率 μ（c_{S_1}，c_{S_2}）一般可以表示为

$$\mu(c_{S_1}, c_{S_2}) = \min[\mu'(c_{S_1}), \mu''(c_{S_2})] \tag{5-59}$$

如果两种底物是可以互相替代，并且可同时被利用，则总的生长比速率可以表示为

$$\mu = \frac{\mu_{\max_1} c_{S_1}}{K_1 + c_{S_1}} + \frac{\mu_{\max_2} c_{S_2}}{K_2 + c_{S_2}} \tag{5-60}$$

这个表达式也可以推广到 n 种底物的情形：

$$\mu = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\mu_{\max_i} c_{S_i}}{K_i + c_{S_i}} \right) \tag{5-61}$$

对于必须有两种必需底物 c_{S_1} 和 c_{S_2} 存在时微生物的生长过程，其动力学表达式为

$$\mu = \frac{\mu_{\max 1} \mu_{\max 2} c_{S_1} c_{S_2}}{(c_{S_1} + K_1)(c_{S_2} + K_2)} \tag{5-62}$$

这一方程可以推广为 n 种必需底物，此时：

$$\mu = \mu_{\max} \prod_{i=1}^{n} \left(\frac{\mu_{\max,i} c_{S_i}}{K_i + c_{S_i}} \right) \tag{5-63}$$

对于存在促进生长底物 $c_{S_{enh}}$ 和必需底物 $c_{S_{ess}}$，Tsao 和 Hanson 提出：

$$\mu = \left(\mu_{\max,0} + \sum_i \frac{\mu_{\max,i} c_{S_{enh,i}}}{c_{S_{enh,i}} + K_{enh,i}} \right) \prod_j \frac{c_{S_{ees,j}}}{c_{S_{ees,j}} + K_{ees,j}} \tag{5-64}$$

该方程中第一部分表明促进生长底物的存在对细胞生长的共同影响，$\mu_{\max,0}$ 为没有促进生长底物存在时的生长比速率，方程第二部分与式（5-63）类似，是必须底物对细胞生长的影响。

微生物分批培养过程动力学模型的参数求解的一般方法

为建立起生长动力学模型，对发酵的过程作了以下几点假设：葡萄糖是发酵过程中唯一的限制性基质；菌体营养供应充足，无内生呼吸存在；发酵过程可视为无抑制的均衡生长方式；pH 已知，且在发酵过程中维持恒定；在生长过程中无产物积累。

基于以上几点假设，对菌体浓度和限制性基质葡萄糖浓度做物料衡算，得到：

$$\begin{cases} \dfrac{dc_X}{dt} = \mu c_X, \\ -\dfrac{dc_S}{dt} = \dfrac{\mu}{y^*_{X/S}} c_X + m c_X, \end{cases} \quad 0 \leqslant t \leqslant 6$$

式中：$y_{X/S}^*$为细胞对底物的理论产率系数；c_X 为生物量；c_S 为底物浓度。生长比速率符合 Monod 方程：

$$\mu = \frac{\mu_{max} c_S}{K_S + c_S}$$

将前述的分批发酵阶段细胞生长模型对实验数据进行拟合。方程 S_1 利用四阶龙格库塔法进行积分，初始条件为

$$\begin{cases} c_S = c_{S_0}, \\ c_X = c_{X_0}, \end{cases} \quad t = 0$$

模型参数估计采用单纯形优化方法，利用计算机使实验值与计算值的偏差尽可能小，其目标函数是：

$$\Phi = \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} \frac{\Delta_{ij}^2}{W_{ij}^2}$$

式中：i 和 j 分别代表实验数据点和变量的个数；W_{ij}代表每个变量的最大值；Δ_{ij} 则是实验值与模型计算值的差值。经优化后得到的结果如表 5-7 所示。

表 5-7　模型参数取值汇总及初始条件

μ_{max} (h^{-1})	K_S ($g \cdot L^{-1}$)	$y_{X/S}^*$ ($s \cdot g^{-1} \cdot g^{-1}$)	m ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	c_S ($g \cdot L^{-1}$)	c_X ($g \cdot L^{-3}$)
0. 45	0. 95	0. 67	0. 05	30	1. 43

因此，在本体系中，生长动力学模型为

$$\mu = \frac{0.45 c_S}{0.95 + c_S}$$

由此得到菌体生长动力学表达式为

$$\frac{dc_X}{dt} = \frac{0.45 c_S}{0.95 + c_S} c_X$$

底物消耗动力学表达式为

$$-\frac{dc_S}{dt} = \frac{0.67 c_S}{0.95 + c_S} c_X + 0.05 c_X$$

5. 2. 4　产物合成动力学

微生物利用底物主要有 3 个作用：①合成新的细胞物质；②合成细胞外产物；③提供必需的能量，用于进行合成反应、维持细胞内物质的浓度与环境的差别或进行细胞内的转化反应。因此，生长、底物利用、维持和产物形成相互关联，各种速率表达式也是相关的。

1. 产物合成的分析　细胞将底物转运入胞内，经过复杂的代谢，合成包括细胞在内的不同代谢产物和能量。图 5-10 是细胞利用底物进行代谢的主要途径示意图。能量主要通过如下两种过程产生：一是底物氧化成 CO_2 和水（氧化磷酸化）；二是底物降解为简单产物（如乙醇、乳酸、柠檬酸，底物水平磷酸化）以及 CO_2 和水等。底物水平磷酸化的产物称为第一类产物（初级代谢产物）。胞外产物包括①胞外酶（用于分解不能通过细胞壁的底物）、②多糖（用于细胞聚集）、③特殊代谢产物（如抗生素），这类产物成为第二类产物（次级代谢产物）。有时含碳底物过量，在其他必须营养缺乏的情况下，可能会合成储能化合物的

内含物，如 PHA、脂肪以及胞外多糖等。

图 5-10 细胞利用底物进行代谢主要途径示意图

2. 产物合成动力学 细胞反应生成的代谢产物包括醇类、有机酸、抗生素和酶等，涉及范围很广。由于细胞内生物合成途径十分复杂，其代谢调节机制也是各具特点，因此至今还没有统一的模型来描述代谢产物生成动力学。研究人员根据产物生成速率与细胞生长速率之间的关系，将其分为 3 种类型，如图 5-11 所示。

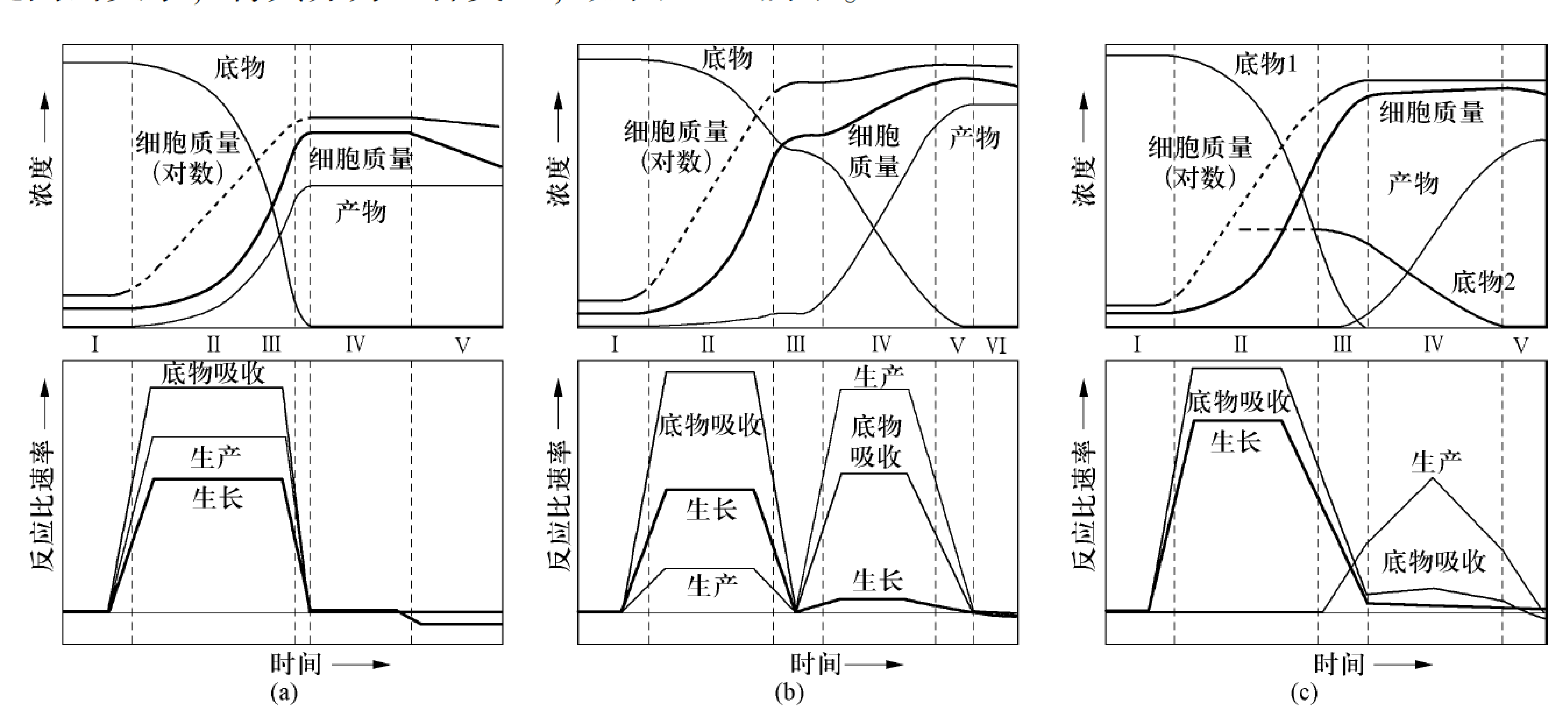


图 5-11 细胞生长和产物合成的关系图

（a）Ⅰ型；（b）Ⅱ型；（c）Ⅲ型

类型Ⅰ称为相关模型，指产物的生成与细胞的生长相关。产物是细胞能量代谢的结果。此时产物通常是底物的分解代谢产物，代谢产物的生成与细胞的生长是同步的。属于此类型的反应有乙醇、葡萄糖酸、乳酸的生产等。其动力学方程可表示为

$$r_P = Y_{P/X} r_X = Y_{P/X} \mu c_X \tag{5-65}$$

$$q_P = Y_{P/X} \mu \tag{5-66}$$

从图 5-11（a）可以看出，此时产物的浓度 – 时间曲线与细胞的相似；产物、细胞和底物三者的速率 – 时间曲线和比速率 – 时间曲线的变化趋势是同步的，都有一最大值，最大值出现的时间相差不大。

类型Ⅱ称为部分相关模型。该类反应的产物生成与底物消耗仅有间接关系。产物是能量代谢的间接结果。在细胞生长期内，基本无产物生成。属于此类型的有柠檬酸和氨基酸的生产。同样从图 5-11（b）可以看出，对此类生长模型，其 μ 和 q_S 下降到一定值后，产物生成才较明显，q_P 增大；当进入产物生成期，q_P 与 μ 和 q_S 基本同步。其动力学方程可表示为

$$r_P = \alpha r_X + \beta c_X \tag{5-67}$$

式中，α、β 为常数，等号右边第一项与细胞生长有关，第二项仅与细胞浓度有关，式（5-67）还可表示为：

$$q_P = \alpha \mu + \beta \tag{5-68}$$

该方程又称为 Luedeking-Piret 方程。

类型Ⅲ称为非相关模型。产物的生成与细胞的生长无直接联系，主要为次级代谢产物。它的特点是当细胞处于生长阶段时，并无产物积累，而当细胞生长停止后，产物却大量生成。属于此类型的有抗生素、微生物毒素等代谢产物的生成。同样从图 5-11（c）可以看出，反应期 r_P、q_P 都很小，反应后期 r_P、q_P 值很大，而 r_X、μ 则很小，甚至为零。此时产物生成速率可表示为

$$r_P = \beta c_X \tag{5-69}$$

$$q_P = \beta \tag{5-70}$$

抗生素、酶等代谢产物与能源代谢无关，是由细胞独立的生物合成反应生成的。建立这类代谢产物生成的动力学模型时，必须清楚产物的生物合成机制，并考察哪些步骤是合成速率控制步骤，才能建立合适的模型。对次级代谢产物的生成速率进行模型化时，最好能够考虑每个细胞的化学组成和代谢活性等性质，不同菌龄的细胞生产活性各异，需要区别对待。对于酶的生成速率，有人还考虑基因水平的调节控制，提出了复杂的模型。

可采用二次函数作为 q_P 和 μ 之间比较通用的关系，即：

$$q_P = A\mu^2 + B\mu + C \tag{5-71}$$

式中，A、B、C 为产物合成动力学方程中的常数，一些微生物反应和酶的合成、氨基酸合成等可用上式表示。

图 5-12 为不同代谢产物类型的细胞生长比速率和产物比速率之间的关系。对于初级代谢产物而言，其合成总是与细胞生长和能量代谢相关联，而次级代谢产物合成往往处于特定的生长状态和生长阶段，它们之间不会呈正相关的关系。

5.2.5　底物消耗动力学

1. 底物消耗的一般动力学　细胞生长时，要消耗底物合成各种细胞组成成分、胞外产

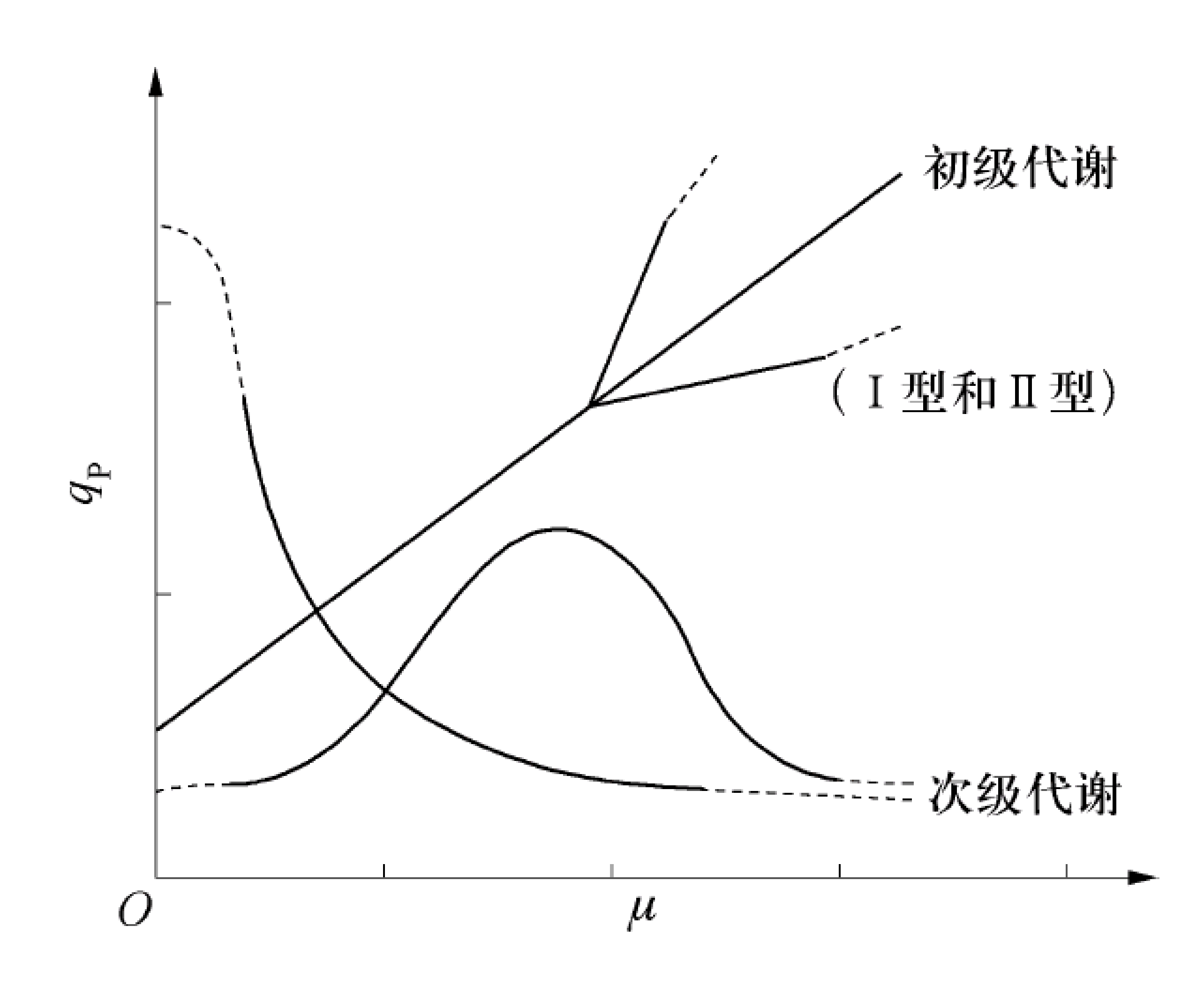


图 5-12　不同代谢类型的比产物合成速率和比生长速率关系示意图

物以及能量。所产生的能量除了用于细胞生长以外，还用于胞外物质的合成以及为了维持细胞正常生理活动所需要的维持能。维持能的用途包括维持细胞内、外的化学物质梯度，修复受损的分子（如 DNA）和组织结构（如细胞膜）、细胞运动及其他与细胞生长没有直接关系的生理活动。

1）不考虑维持能时：以单位体积反应液中底物的消耗速率表示底物消耗动力学，有

$$r_S = \frac{1}{Y_{X/S}} r_X = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu c_X = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\mu_m c_S c_X}{K_S + c_S} \tag{5-72}$$

以单位质量干细胞在单位时间内的底物消耗量即底物的比消耗速率表示，有

$$q_S = \frac{r_S}{c_X} = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\mu c_S}{K_S + c_S} = q_{S_m} \frac{c_S}{K_S + c_S} \tag{5-73}$$

2）考虑维持能时：细胞生长旺盛时，用于细胞维持的底物消耗所占的比例相对较小，常被忽略。但如果细胞的比生长速率较小或细胞密度较大时，就需要考虑维持能。这时底物消耗速率可以用以下方程表示：

$$r_S = \frac{1}{Y_G} r_X + m_S c_X + \frac{1}{Y_P} r_P \tag{5-74}$$

$$q_S = \frac{1}{Y_G} \mu + m_S + \frac{1}{Y_P} q_P \tag{5-75}$$

式中：Y_G 为理论细胞得率系数；Y_P 为理论产物得率系数；m_S 为维持系数（$g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$）。上述方程右侧第三项是否存在需要根据具体情况进行分析。

维持系数 m_S 是微生物菌株的一种特性值。对于特定的菌株、底物和环境条件，它为常数。维持系数越低，细胞的能量代谢效率越高。定义为单位质量干细胞在单位时间内，因维持代谢所消耗底物的量。与产率系数定义式对照有：

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m_S}{\mu} + \frac{1}{Y_P \cdot Y_{X/P}} \tag{5-76}$$

从上式可知，当 $m_S = 0$ 时，有：

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_G} + \frac{1}{Y_P \cdot Y_{X/P}} \tag{5-77}$$

当 m_S 为常数时，如 $\mu \to 0$，底物消耗主要用于维持；$\mu \to \infty$，底物消耗用于维持的则较少，主要用于生长以及产物合成。

在底物浓度很低时，可能出现生长速率等于零的情况。若底物浓度进一步降低至不足以满足细胞维持能所需，细胞会消耗一部分细胞内含物以满足维持生理活性的要求，这样的活动称为内源代谢（endogenous metabolism）或内源呼吸（endogenous respiration）。这时细胞的生长比速率可以描述为

$$\mu = \frac{\mu_m c_S}{K_S + c_S} - K_e \tag{5-78}$$

式中，K_e 为内源代谢速率常数。

2. 氧的消耗动力学　氧气在好氧微生物反应过程中起着举足轻重的作用，它是一种特殊的底物，在传质良好且满足微生物生长的条件下，其消耗动力学符合一般底物动力学。如果不考虑其他产物的合成，有

$$r_{O_2} = \frac{1}{Y_{GO_2}} r_X + m_{O_2} c_X \tag{5-79}$$

$$q_{O_2} = \frac{1}{Y_{GO_2}} \mu + m_{O_2} \tag{5-80}$$

$$\frac{1}{Y_{X/O_2}} = \frac{1}{Y_{GO_2}} + \frac{m_{O_2}}{\mu} \tag{5-81}$$

式中，Y_{GO_2} 为相对于氧的理论细胞得率系数。

3. 底物消耗动力学分析　驱动细胞生命活动的能量是 ATP 或其他高能化合物所携带的化学能。细胞在厌氧或好氧培养时，分解底物产生能量和各种代谢产物，如图 5-13 所示。好氧培养时，ATP 主要由底物经氧化磷酸化分解产生能量，同时产生 H_2O 和 CO_2，厌氧培养时，ATP 以及其他能量物质通过底物水平磷酸化降解底物为小分子化合物如醇、乳酸、H_2O 和 CO_2 等，然后释放到细胞外。ATP 的消耗主要用于合成产物、细胞增殖以及细胞维持。

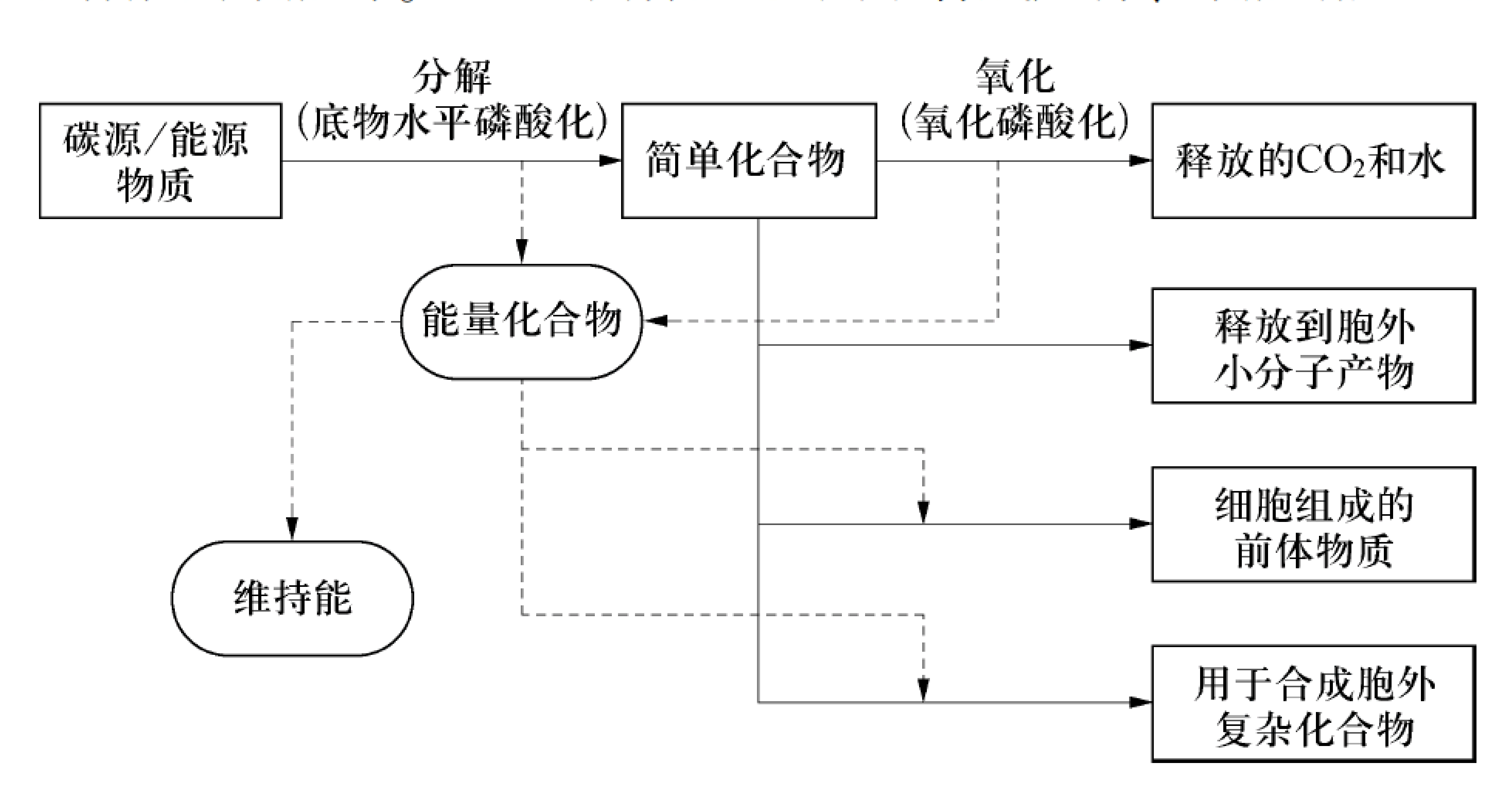


图 5-13　细胞分解底物产能和合成产物的示意图

底物的利用及其动力学和产物合成与细胞生长之间是否耦联有关，如图 5-14 所示。

对于Ⅰ型产物合成，产物往往是小分子，伴随着细胞产能途径产生。如乙醇的代谢。这类产物合成直接与能量的产生相联系，底物消耗的同时也支持了细胞维持和生长，无须专门吸收底物用于这些产物的合成，所以在底物消耗速率方程及动力学方程中不包含单独的关于产物生成的一项。对于Ⅱ型或Ⅲ型产物，其合成的特点是底物部分或全部用于生成产物，能量代谢不与或部分与产物相联系，如胞外多糖、酶、抗生素等，底物消耗速率取决于细胞生长速率、产物生成速率和其消耗与维持能的速率。

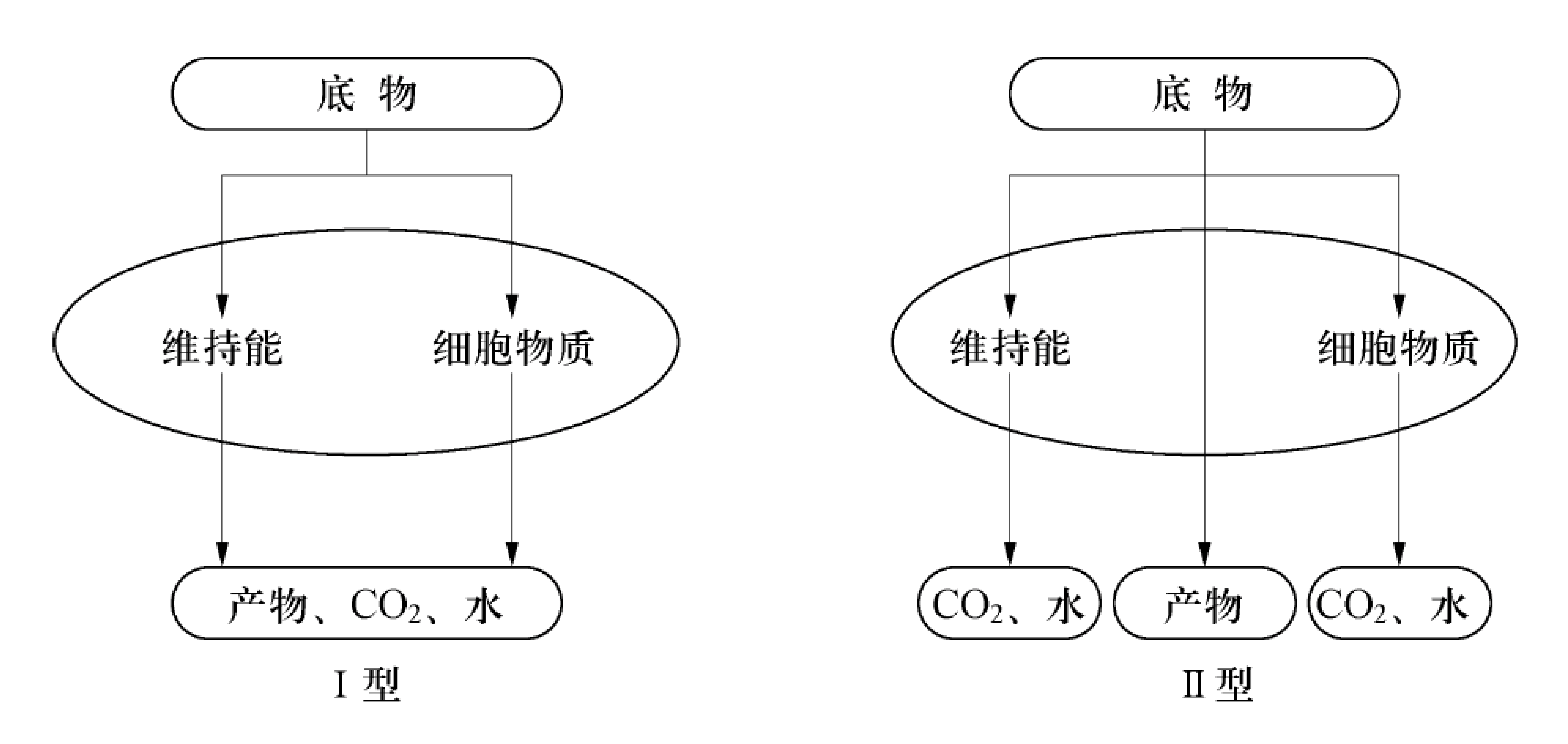


图 5-14　底物消耗与产物合成的关系

例 5-1　微生物分批培养数据列于表 5-8。N 表示氮源、S 表示碳源/能源，X 表示微生物细胞。求微生物生长、底物消耗、产物生成的速率和相应的动力学参数。并进一步计算：

（1）细胞最大生长比速率 μ_{max} 和 Monod 方程参数；

（2）维持常数 m_S 和理论产率系数 $Y_{X/S}$；

（3）生物量对氮源的理论产率系数 $Y_{X/N}$。

表 5-8　微生物分批培养实验数据

t（h）	c_X（$kg \cdot m^{-3}$）	c_S（$kg \cdot m^{-3}$）	c_N（$kg \cdot m^{-3}$）
0	0. 11	40. 00	4. 00
1	0. 134	39. 93	4. 00
2	0. 180	39. 83	3. 99
3	0. 241	39. 20	3. 98
4	0. 323	39. 50	3. 97
5	0. 433	39. 30	3. 96
6	0. 581	39. 10	3. 94
7	0. 778	38. 50	3. 92
8	1. 040	37. 80	3. 88
9	4. 400	37. 20	3. 84
10	1. 870	35. 40	3. 78
11	2. 500	34. 80	3. 70
12	3. 350	32. 90	3. 59
13	4. 490	29. 50	3. 44
14	6. 000	27. 20	3. 24
15	8. 000	21. 80	2. 97
16	10. 700	17. 10	2. 57
17	14. 100	9. 60	1. 89
18	17. 900	1. 11	1. 50
19	18. 300	0. 00	1. 49
20	18. 300	0. 00	1. 48

解　在生长过程结束时，生物量没有减少，可以忽略微生物死亡。假设微生物生长符合 Monod 动力学，生长限制性底物是碳源和能源物质 S。

（a）采用双倒数法作图（Lineweaver-Burk plot）法估算 μ_{max} 和 K_S：Monod 模型的双倒数方程为

$$\frac{1}{\mu}=\frac{K_S}{\mu_{max}c_S}+\frac{1}{\mu_{max}}$$

得到 $1/\mu-1/c_S$ 图后，即可根据 Y 轴截距得到 $1/\mu_{max}$，根据斜率得到 K_S。对于本题可以先计算随着 c_S 变化的 μ。对于分批培养过程，存在：

$$\frac{dc_X}{dt}=r_X=\mu\cdot c_X$$

可得：

$$\mu=\frac{1}{c_X}\frac{dc_X}{dt}$$

根据细胞浓度 c_X 对时间 t 的曲线，可以计算 dc_X/dt，代入上式即可得到 μ 和 $1/\mu$。

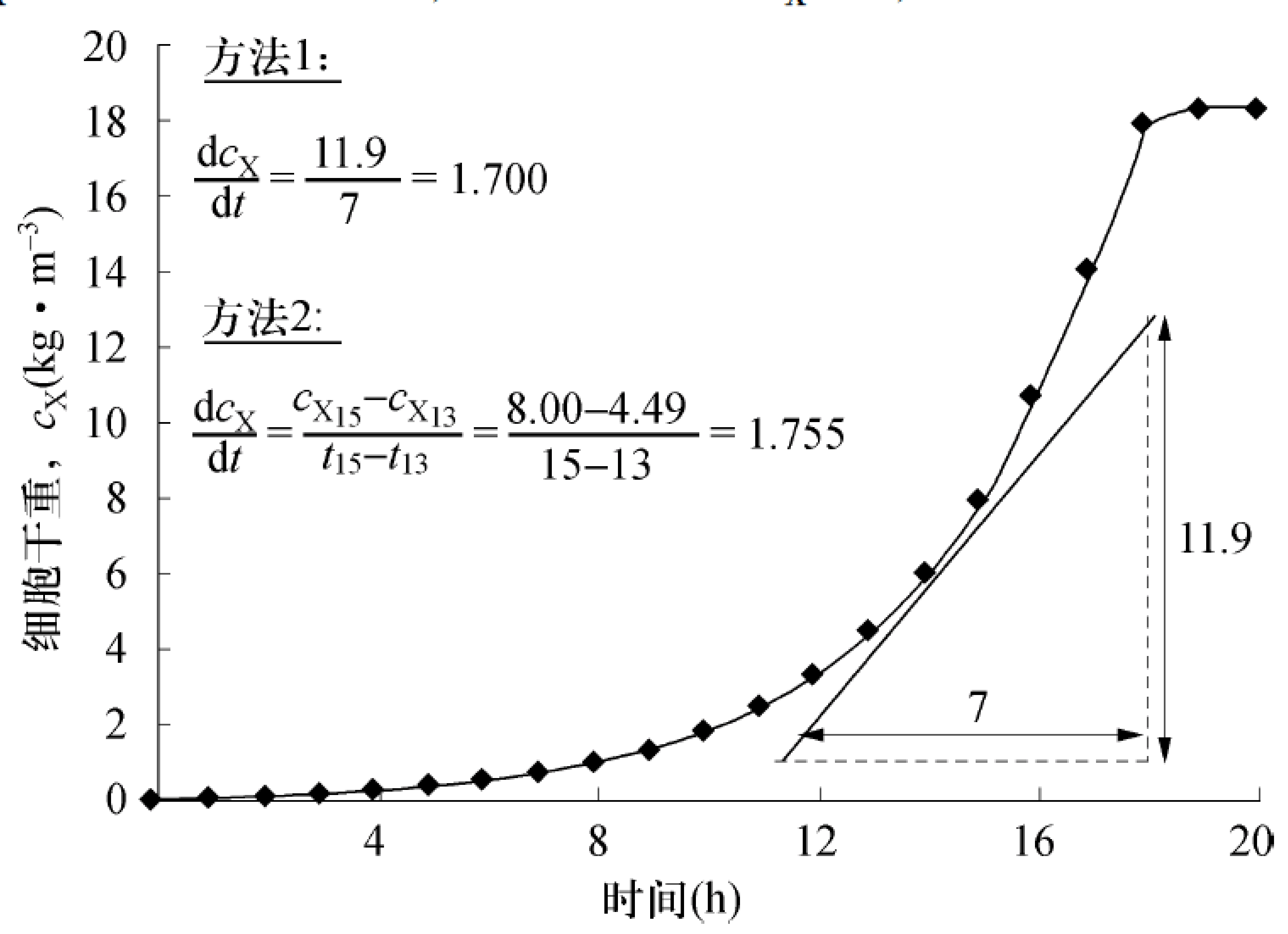


图 5-15　细胞生长曲线以及不同时间生长速率的计算

如何得到时间微分 d（…）/dt：

方法一：动力学曲线的切线。根据实验数据点得到光滑曲线，作出切线，计算斜率，如图 5-15 中 14h 处。

方法二：数值微分。在所要分析的时间点（t = 14h）两侧取值相同，除以合适的时间间隔，如图 5-15 所示。

方法三：曲线拟合。使用软件绘制曲线后，继续进行曲线拟合得到方程计算。

根据以上方法得到不同底物浓度 c_S 下的 $1/\mu$，列于表 5-9 中，双倒数法作图如图 5-16 所示。由 Y 轴截距可得：

$$\mu_{max}=\frac{1}{3.4}=0.294\ (h^{-1})$$

由 X 轴截距，计算可得：

$$K_S=\frac{1}{0.6}=1.67\ (kg\cdot m^{-3})$$

同时可以根据斜率进行进一步验算。即斜率 $=\frac{K_S}{\mu_{max}}=5.67$（kg（葡萄糖）·h·m^{-3}）。

表 5-9　实验数据及部分计算处理的数据

t（h）	c_X（$kg \cdot m^{-3}$）	$r_X = \frac{dc_X}{dt}$	$\mu = \frac{r_X}{c_X}$	$1/\mu$	c_S	$1/c_S$
0	0. 100				40. 00	0. 0250
1	0. 134	0. 040	0. 299	3. 350	39. 93	0. 0250
2	0. 180	0. 054	0. 297	3. 364	39. 83	0. 0251
3	0. 241	0. 072	0. 297	3. 371	39. 70	0. 0252
...	...	...	...	...	...	...
12	3. 350	0. 995	0. 297	3. 367	32. 90	0. 0304
13	4. 490	1. 325	0. 295	3. 389	30. 50	0. 0328
14	6. 000	1. 755	0. 293	3. 419	27. 20	0. 0368
15	8. 000	2. 350	0. 294	3. 404	22. 80	0. 0439
16	10. 700	3. 050	0. 285	3. 508	17. 10	0. 0585
17	14. 100	3. 600	0. 255	3. 917	9. 60	0. 1042
18	17. 900			8. 547	1. 11	0. 9009

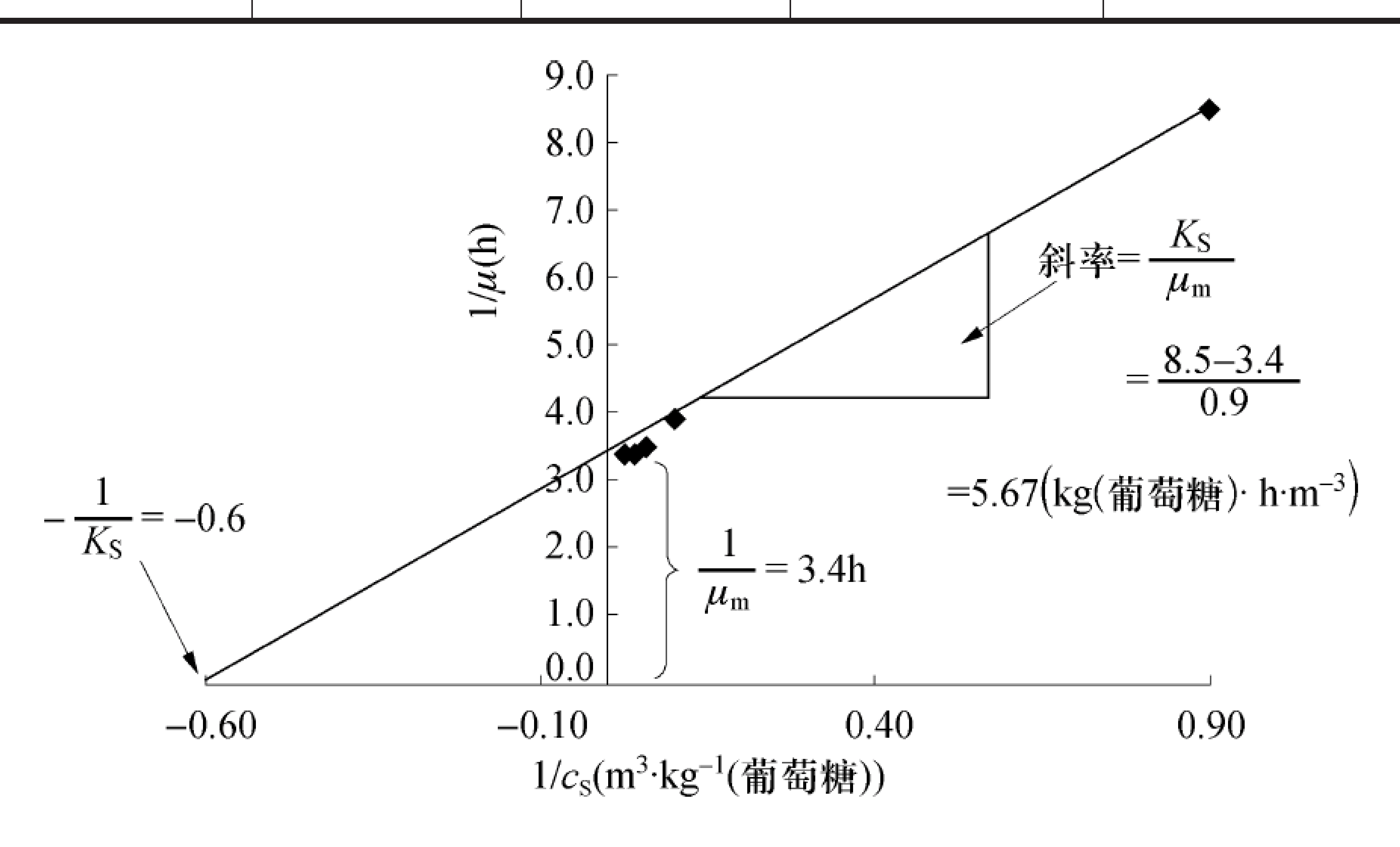


图 5-16　$1/\mu - 1/c_S$ 关系图

（b）估算维持常数 m_S 和理论产率系数 Y_G。

对于消耗的底物，考虑细胞生长和维持而没有产物合成，可以得到

$$r_S = \frac{1}{Y_G} r_X + m_S c_X = \frac{\mu c_X}{Y_G} + m_S c_X$$

方程两侧除以 c_X，得

$$\frac{r_S}{c_X} = \frac{1}{Y_G} \cdot \frac{r_X}{c_X} + m_S$$

根据该方程作 $r_S/c_X - r_S/c_X$ 图，可以得到直线，斜率为 $1/Y_G$，Y 轴截距为 m_S。先估算过程中不同时间的 r_S。对于分批发酵中的数据进行碳源平衡可得

$$\frac{dc_S}{dt} = -r_S$$

与（a）中方法相同，将实验数据进行计算与处理，列于表 5-10 中。

表 5-10　依据实验数据计算的生长速率（r_X）和底物、氮源消耗速率（r_S、r_N）

t(h)	c_X(kg·m^{-3})	c_S(kg·m^{-3})	c_N(kg·m^{-3})	r_X	r_S	r_N	r_S/c_X	r_X/c_X
0	0. 100	40. 00	40. 00					
1	0. 134	39. 93	4. 00	0. 040	0. 085	0. 005	0. 634	0. 299
2	0. 180	39. 83	3. 99	0. 054	0. 115	0. 010	0. 639	0. 297
3	0. 241	39. 70	3. 98	0. 072	0. 165	0. 010	0. 685	0. 297
...	...	...	...	...	...	...	...	...
12	3. 350	32. 90	3. 59	0. 995	2. 150	0. 130	0. 642	0. 297
13	4. 490	30. 50	3. 44	1. 325	2. 850	0. 175	0. 635	0. 295
14	6. 000	27. 20	3. 24	1. 755	3. 850	0. 235	0. 642	0. 293
15	8. 000	22. 80	2. 97	2. 350	5. 050	0. 335	0. 631	0. 294
...	...	...	...	...	...	...	...	...
18	17. 900	1. 11	1. 50	2. 100	4. 800	0. 300	0. 268	0. 117
19	18. 300	0. 00	1. 49					
20	18. 300	0. 00	1. 48					

用表 5-10 中数据作图，如图 5-17 维持能和理论产率系数的估算所示，可得：

$$m_S = 0.06\ (\text{kg}（葡萄糖）\cdot \text{kg}^{-1}（细胞）\cdot \text{h}^{-1})$$

$$Y_G = 0.51\ (\text{kg}（细胞）\cdot \text{kg}^{-1}（葡萄糖）)$$

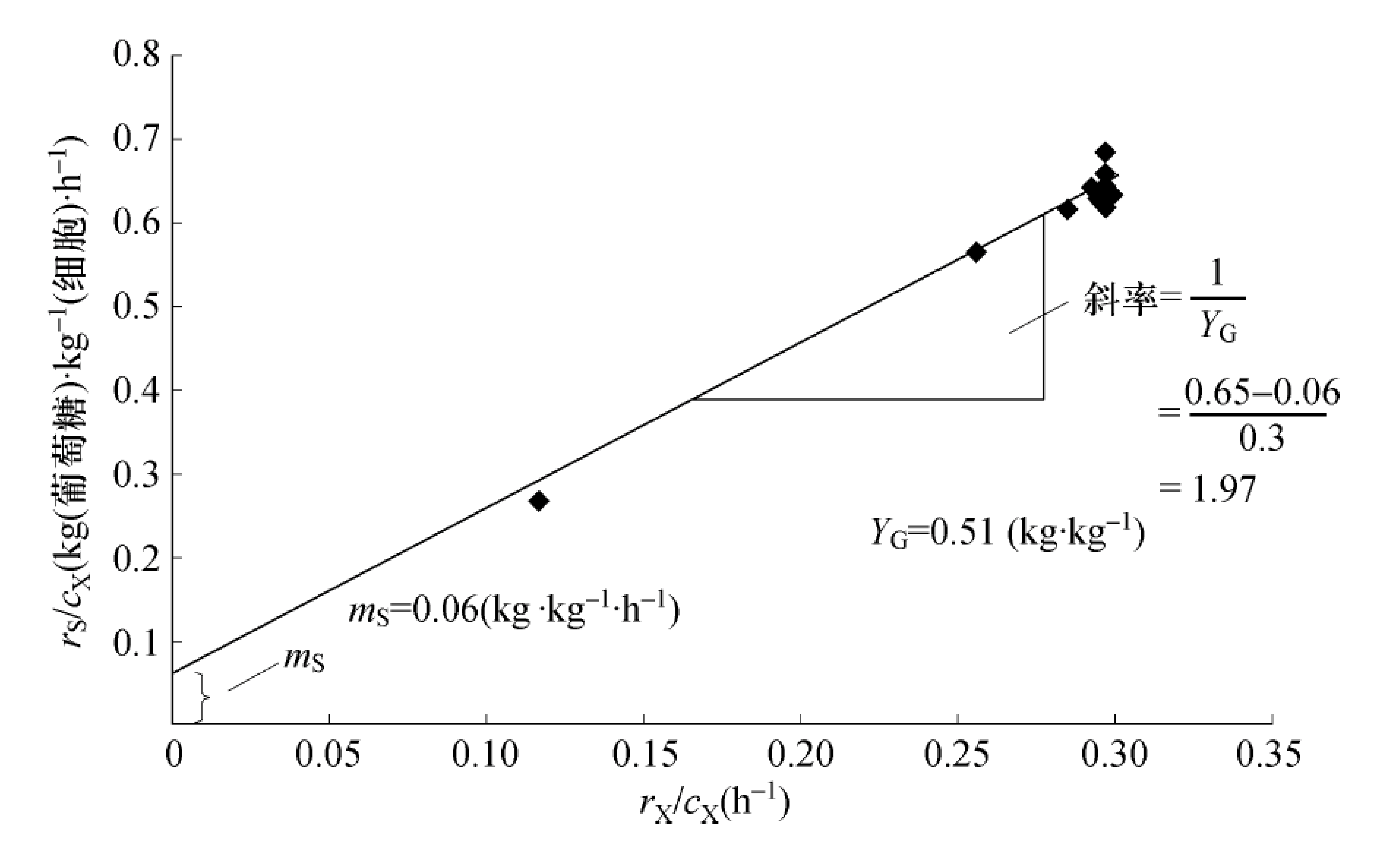


图 5-17　维持能和理论产率系数的估算

（c）生物量对氮源的产率系数：根据分批发酵的氮源平衡可得

$$\frac{dc_N}{dt} = -r_N = -\frac{r_X}{Y_G} = -\frac{\mu c_X}{Y_G}$$

根据上式，通过作图可以得到不同时间的氮源吸收速率。$r_N - r_X$ 关系如图 5-18 所示。生长过程中，氮源只用于生长，没有维持消耗。根据斜率可得：

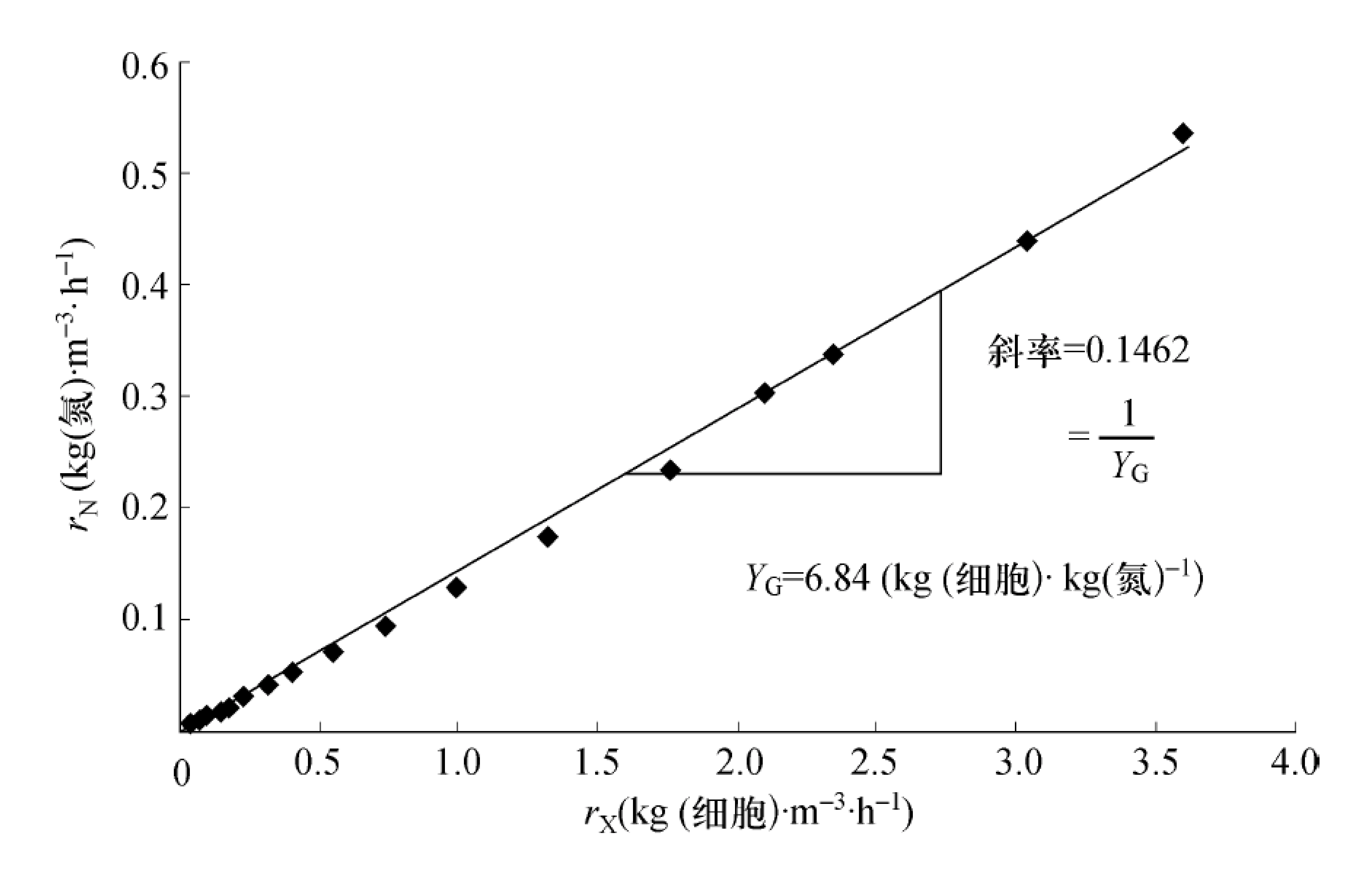


图 5-18　生物量对氮源的产率系数估算

$$Y_G = 6.84\ (\mathrm{kg}\ (\text{细胞})\ \cdot \mathrm{kg}^{-1}\ (\text{氮}))$$

将所得参数代入相应的动力学方程中，分批培养过程可以下列方程表示生长和碳源、氮源消耗：

$$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = r_X = 0.294\frac{c_S}{1.67 + c_S}c_X$$

$$\frac{\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t} = -r_S = -\frac{1}{0.51}\left(0.294\frac{c_S}{1.67 + c_S}c_X\right) - 0.06c_X$$

$$\frac{\mathrm{d}c_N}{\mathrm{d}t} = -r_N = -\frac{1}{6.84}r_X = -\frac{1}{6.84}\left(0.294\frac{c_S}{1.67 + c_S}c_X\right)$$

这 3 个方程表述了分批发酵过程中细胞浓度、碳源、氮源浓度随时间的变化过程。可以通过积分的方法（可以借助数学软件如 MathCad）得到浓度和时间的关系曲线，如图 5-19 所示。

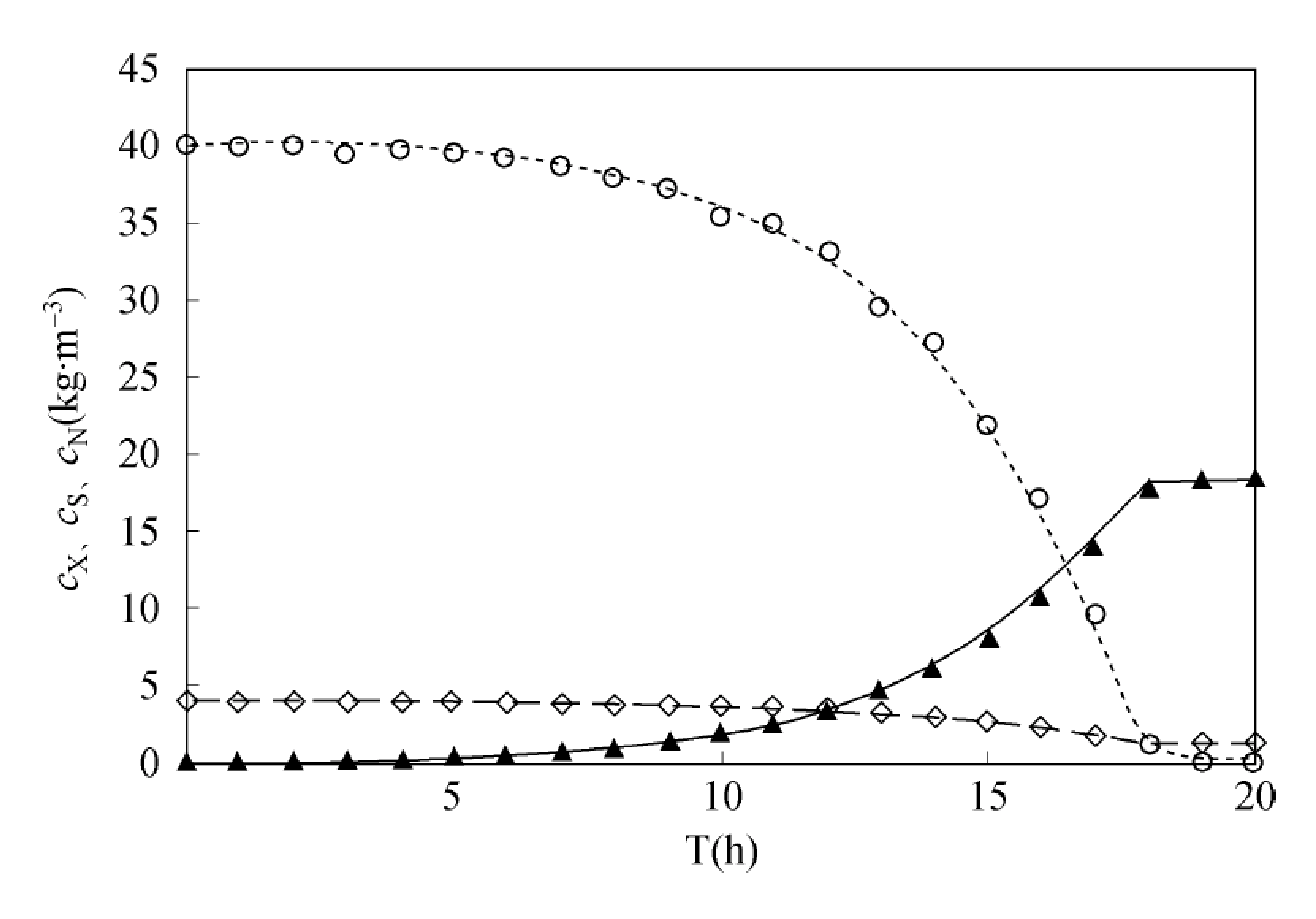


图 5-19　实验与模型预测的过程曲线

◇c_N exp ———c_N cal；▲ c_X exp ——— c_X cal；○ c_S exp -------c_S cal

5.3　微生物生长结构模型简介

以 Monod 模型为代表的非结构模型描述的是稳定状态的均衡生长过程，假设细胞内部的各种物质比例恒定，也不考虑胞内复杂的代谢反应，自然也就不能期望这些模型可以预测细胞内部随着外界条件变化的动力学行为，因此在揭示胞内的调节及动力学模型时的作用很有限。当细胞组成发生变化、细胞活力发生改变时，就不可能通过简单的模型来推测细胞反应过程了。结构模型在一定程度上整合了细胞反应的机制，可以采用一套参数描述在不同的生长条件下的生长过程，提高了对过程的预测准确度。

在结构模型中，细胞活力（microbial activity）不仅和非生物因素有关，还与细胞内部的结构有关，如不同的酶、代谢产物或其他细胞组分。通过将细胞解构化为几种化合物，以及相互之间、与环境之间以物质、信息流相联系的功能团，细胞结构模型可以说明微生物的生理状态，组成和适应环境的调节机制。如果将功能团简化成理想化的代谢网络，如可以将生物合成系统看做一个反应，这就形成复杂程度较低的分室模型（compartment model）；如果将细胞尽可能分解成各步反应，考虑最基本的代谢机制和反应动力学特性，这就产生了单细胞模型（single-cell model）。结构模型可以分为多室模型（multi-compartment model）、控制模型（cybernetic model）、遗传结构模型（genetically structure model）等几类。在构建模型时，采用尽可能少的功能团，去描述重要的胞内过程，可以使模型简单，状态变量和参数也尽可能的少，否则将会使模型的数据验证和参数求解变得极为困难。

5.3.1　分室模型

分室模型是细胞生长动力学结构模型中较为简单的一种，由 Williams 和 Ramkrishna 等同时于 1967 年提出。该模型是将细胞内的具有相似功能和动力学特点的生物质集中到几个池（pool）中。每个室以一个可代表该室中代谢产物和酶浓度的量作为单变量进行模型化。分室模型主要用来描述细胞的一般特性，如在培养过程中和完整代谢功能团调节时的 RNA 或 DNA 量的变化。

1. 模型假设

（1）胞内生物质分为两个室：一个为生物质反应室，或合成室，以 K 表示，主要由前体物质和 RNA 组成；另一个为结构室，或称遗传室，以 G 表示，主要由蛋白质和 DNA 组成。一般认为 G 室中的物质不参与反应，RNA 在蛋白质合成中起着核心作用，RNA 的合成是限制因素。K、G 室与胞外环境中底物的关系如图 5-20 所示。

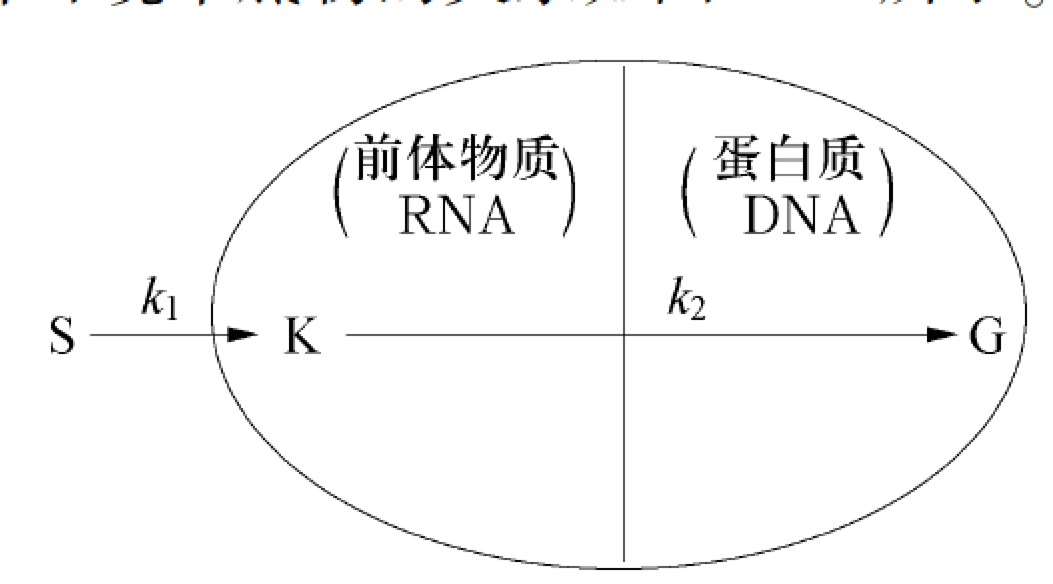


图 5-20　分室模型中 K、G 室与胞外环境中底物的关系

k_1 为基质向 K 室转化的速率常数；k_2 为 K 室向 G 室转化的速率常数

（2）反应体系总体积为 V_R，其中细胞所占的体积为 V_X，细胞密度为 ρ_X。

$$\rho_X = \frac{m_X}{V_X} \tag{5-82}$$

式中：ρ_X 为分室模型中的细胞密度；m_X 为分室模型中的细胞质量。ρ_X 与 K 室、G 室的密度 ρ_K、ρ_G 的关系为

$$\rho_X = \rho_K + \rho_G \tag{5-83}$$

（3）细胞吸收底物将其转化为 K 室的组分，同时，在细胞内 K 室组分又按照一定的速率转化 G 室的组分。该过程可表示为

$$S \xrightarrow{r_{SG}} K \xrightarrow{r_{KG}} G \tag{5-84}$$

（4）细胞吸收底物将其转化为 K 室组分，该反应的速率与反应体系中的细胞浓度 c_X 和底物浓度 c_S 成正比；底物转化为细胞组分的得率系数为 $Y_{X/S}$；在细胞内，K 室按一定速率转化为 G 室，反应速率与 K 室和 G 室在细胞中的浓度的乘积（$\rho_G\rho_K$）成正比。细胞内 G 室质量的加倍（即 DNA 复制完成）是细胞分裂的充分必要条件。从宏观上看，细胞数量与反应体系中 G 室的质量（$\rho_G V_X$）成正比。

2. 双室模型对细胞反应过程的描述 根据模型假设，分批培养反应体系中各组分的变化描述如下。

对细胞：
$$\frac{d(c_X V_R)}{dt} = k_1 c_S c_X V_R \tag{5-85}$$

对底物：
$$\frac{d(c_S V_R)}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} k_1 c_S c_X V_R \tag{5-86}$$

对 K 室：
$$\frac{d(\rho_K V_X)}{dt} = k_1 c_S \rho_X V_X - k_2 \rho_K \rho_G V_X \tag{5-87}$$

对 G 室：
$$\frac{d(\rho_G V_X)}{dt} = k_2 \rho_K \rho_G V_X \tag{5-88}$$

假设细胞密度 ρ_X 为常数，由于反应体系的体积 V_R 也是常数，生长比速率可以用细胞体积来表示为

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{d(c_X)}{dt} = \frac{1}{\rho_X V_X / V_R} \cdot \frac{d(\rho_X V_X / V_R)}{dt} = \frac{1}{V_X} \cdot \frac{d(V_X)}{dt} \tag{5-89}$$

由式（5-85）可知，此处 $\mu = k_1 c_S$。所以式（5-89）可写为

$$\frac{1}{V_X} \cdot \frac{d(V_X)}{dt} = k_1 c_S \tag{5-90}$$

因此质量平衡方程组可以简化为

对细胞：
$$\frac{dc_X}{dt} = k_1 c_S c_X \tag{5-91}$$

对底物：
$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} k_1 c_S c_X \tag{5-92}$$

对 K 室：
$$\frac{d\rho_K}{dt} = k_1 c_S \rho_X - k_2 \rho_K \rho_G - k_1 c_S \rho_K \tag{5-93}$$

对 G 室：
$$\frac{d\rho_G}{dt} = k_2 \rho_K \rho_G - k_1 c_S \rho_G \tag{5-94}$$

若用反应体系体积 V_R 来定义上述生物质和底物浓度，则有

$$c_X = \frac{V_X}{V_R}\rho_X \tag{5-95}$$

$$c_K = \frac{V_X}{V_R}\rho_K \tag{5-96}$$

$$c_G = \frac{V_X}{V_R}\rho_G \tag{5-97}$$

则式（5-93）和式（5-94）为

$$\frac{dc_K}{dt} = \left(\frac{V_R}{V_R - V_X}\right)k_1 c_S c_X - \left(\frac{V_R}{V_X}\right)k_2 c_K c_G \tag{5-98}$$

$$\frac{dc_G}{dt} = \left(\frac{V_R}{V_X}\right)k_2 c_K c_G \tag{5-99}$$

细胞的相对大小（以稳定期不含 K 室的单个细胞体积为基准）可表示为

$$细胞相对尺寸 = \frac{\rho_G + \rho_K}{\rho_G} \tag{5-100}$$

3. 双室模型的应用　Williams 双室模型可以描述间歇生长的迟滞期，以及在生长过程中因细胞尺寸的变化导致细胞生物量的增加与细胞数目增加的不同步现象，如图 5-21 所示。接种细胞是对数生长期末期的细胞，胞内 K 室物质含量为零，接入新鲜培养基后，细胞迅速利用底物合成新的 K 室物质，因此细胞尺寸迅速增大，但总的生物量也相应增加。由于 G 室是从 K 室转化来的，因此细胞数目的增加则明显滞后。

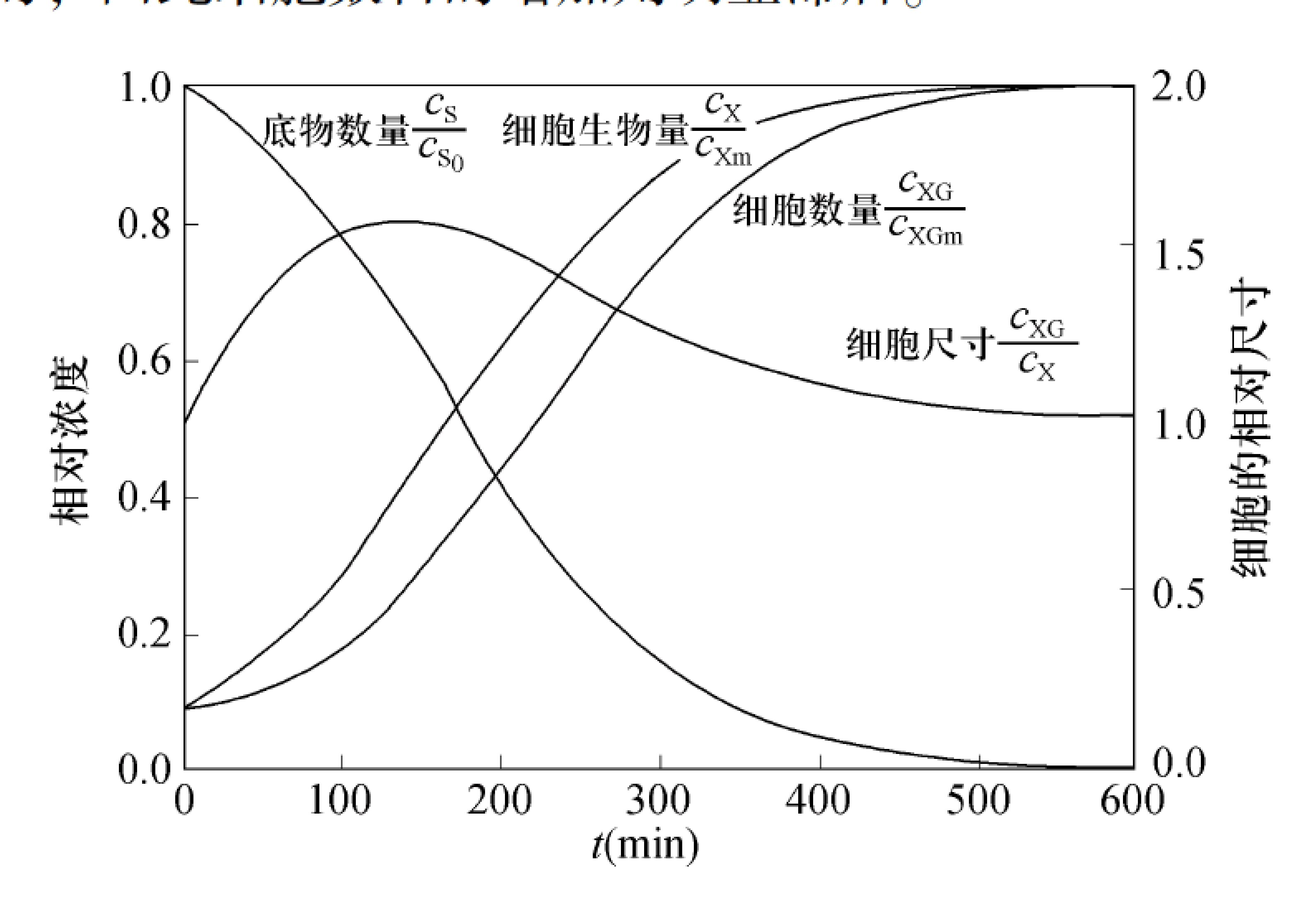


图 5-21　双室模型对分批生长过程模拟曲线

对于分室模型，“室”的多少和代表的功能团往往要根据微生物过程来确定。如采用 6 室（DNA、RNA、蛋白质、氨基酸、核苷酸、结构化合物）模型描述链霉菌生产抗生素，4 室（RNA、宿主基因组、质粒基因组、外源蛋白）或 8 室（还包括氨基酸、核苷酸、脂、内源蛋白）模型描述外源蛋白在大肠杆菌中的诱导表达。图 5-22 为重组 *E. coli* 294 发酵生成 *Eco*RI 内切酶的三室模型示意图，A 室是细胞的活性部分，主要为核糖体、mRNA、tRNA 及各种活性成分，其中 60% 以上是 RNA，可以通过测定 RNA 来估计含量；P 室是细胞的产物部分，主要为质粒的产物 *Eco*RI 内切酶，可通过酶活力测定，G 室是细胞的结构部分，包含 DNA（基因组和质粒）、脂类和糖类，其大小与 A 室和 P 室直接相关，可通过全细胞减去 A 室和 P 室得到。图 5-23 为重组菌株以不同初始葡萄糖浓度生产 *Eco*RI 内切酶过程的实验

数据以及三室模型模拟曲线图。

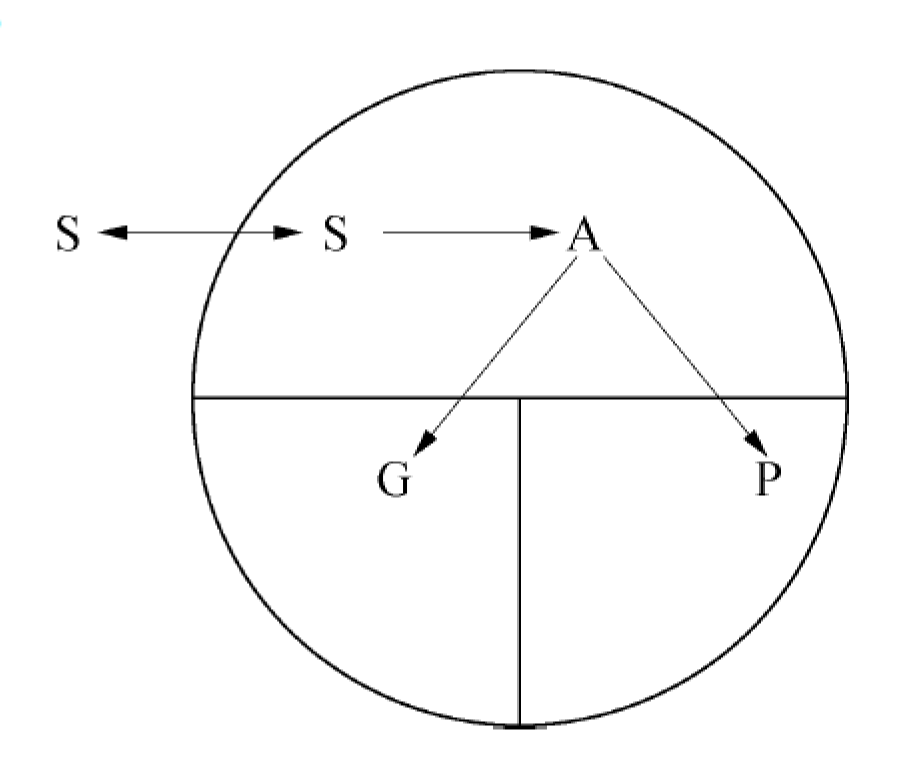


图 5-22　重组 *E. coli* 294 发酵生成 *Eco*RI 内切酶的三室模型示意图

图 5-23　重组菌株在不同初始葡萄糖浓度下生产 *Eco*RI 内切酶过程和三室模型模拟曲线图

(a) 5g · L^{-1}；(b) 10g · L^{-1}；(c) 15g · L^{-1}；(d) 20g · L^{-1}。▲ 表示 X_A；× 表示 X_G；● 表示 X_P

符号表示实验测定结果；实线表示模型模拟结果

5.3.2 控制模型

控制模型采用优化控制原理描述微生物反应过程，常用于多底物的生长动力学。对于多底物培养系统，细胞对底物的利用通常需要复杂的调控机制，而简单的动力学模型很难描述。一般的结构模型参数较多，机制和动力学复杂，而控制模型不考虑微生物如何协调代谢反应以获得优化控制的机制，认为这已经在进化过程中实现，并且可用以确定优化准则。一旦这些准则和生长过程中一般性的限制如底物吸收和酶合成能力等已经了解，就可以通过控制论模型来计算任何时候的反应速率，无须了解内在机制。控制论模型可以单底物过程的结果来预测顺序或并行利用多底物的情况。

微生物利用多个底物时，胞内调节包括 2 个方面：一是通过抑制和活化来控制关键酶的活性，这是在反应水平上的调控，用酶的活性控制变量 W_i 表示，这种调控速率较快；二是通过诱导和阻遏来调节酶的水平，即关键酶的合成速率，这是在基因水平的调控，通过控制基因的翻译来影响酶的浓度，用浓度控制变量 u_i 表示。

1. 模型建立　主要步骤包括：①确定细胞的优化控制目标；②建立酶合成和细胞生长的动力学方程；③建立诱导和抑制的慢动态调节模型，确定细胞合成能力。

对于有 N 个底物的反应体系，细胞在其中任一底物 i 上的生长，用控制模型可以表示为

$$X + S_i \xrightarrow{\text{关键酶}} (1 + Y_{X/S_i})\ X_i \tag{5-101}$$

若该反应的本征动力学可以用 Monod 方程表示，则对于 i 底物，细胞的生长比速率为

$$\mu_i = \mu_{m,i} \frac{c_{S_i}}{K_{S_i} + c_{S_i}} \bar{c}_{E_i} W_i \tag{5-102}$$

式中：$\bar{c}_{E_i}$ 为关键酶的本征浓度；W_i 为酶活力控制变量。

以 N 个底物的生长时，细胞总的生长比速率可表示为

$$\mu = \sum_{i=1}^{N} \mu_{m,i} \frac{c_{S_i}}{K_{S_i} + c_{S_i}} \bar{c}_{E_i} W_i \tag{5-103}$$

关键酶的合成速率可以通过本征浓度的衡算表示为

$$\frac{d\bar{c}_{E_i}}{dt} = r_{m,E_i} \frac{c_{S_i}}{K_{S_i}^{E} + c_{S_i}} u_i + r_{E_i0} - k_{d,E_i} \bar{c}_{E_i} \tag{5-104}$$

式中：u_i 为酶合成速率的控制变量；r_{E_i0} 为关键酶的组成性合成速率；k_{d,E_i} 为酶的分裂速率常数。

2. 控制变量的分析　经济学的 Hersteins 匹配定律认为当分配分率等于回报分率，总的回报是最大的。在控制模型中，所分配的资源是指用于合成能给出最高生长比速率的酶。上述模型中 u_i 为酶合成速率的控制变量，又称资源分配率，是指细胞中总的酶合成速率中用于 i 底物利用的关键酶的分率。u_i 通过诱导和阻遏来控制，存在

$$\underset{(\text{完全阻遏})}{0} \leqslant u_i \leqslant \underset{(\text{完全诱导})}{1}, \qquad \sum u_i = 1 \tag{5-105}$$

u_i 为分配给第 i 底物吸收的所耗用资源的比例，可以表示为

$$u_i = \frac{\mu_{\mathrm{m},i}\dfrac{c_{\mathrm{S}_i}}{K_{\mathrm{S}_i}+c_{\mathrm{S}_i}}\bar{c}_{\mathrm{E}_i}}{\sum_{j=1}^{N}\left(\mu_{\mathrm{m},j}\dfrac{c_{\mathrm{S}_j}}{K_{\mathrm{S}_j}+c_{\mathrm{S}_j}}\bar{c}_{\mathrm{E}_j}\right)} \tag{5-106}$$

式中，分子为途径 i 所期望的最大收益，分母为总的最大收益。

酶活力控制变量 W_i 是细胞对底物的快速响应，通过抑制和活化来快速调控关键酶的活力，以保证细胞生长在其最合适的底物上，并具有高的生长比速率，存在如下关系：

$$\underset{(\text{完全抑制})}{0} \leqslant W_i \leqslant \underset{(\text{完全活化})}{1} \tag{5-107}$$

其大小根据启发式策略确定，表示为

$$W_i = \frac{\mu_{m,i}\dfrac{c_{\mathrm{S}_i}}{K_{\mathrm{S}_i}+c_{\mathrm{S}_i}}\bar{c}_{\mathrm{E}_i}}{\max\limits_j\left(\mu_{m,j}\dfrac{c_{\mathrm{S}_j}}{K_{\mathrm{S}_j}+c_{\mathrm{S}_j}}\bar{c}_{\mathrm{E}_j}\right)} \tag{5-108}$$

式中，分子表示对 i 途径所预期的最大收益，分母表示所有途径中能获得最大利益的途径 j 所获得的利益。当 $W_i=1$ 时，i 途径为最大收益途径。

应用上述原理和方法，可以将控制论模型用于不同的细胞生长过程。如非耦联生长过程，底物顺序利用生长过程、多底物同时利用生长过程。图 5-24 为控制模型模拟的骨髓瘤细胞生长过程中的细胞、底物、产物变化曲线。

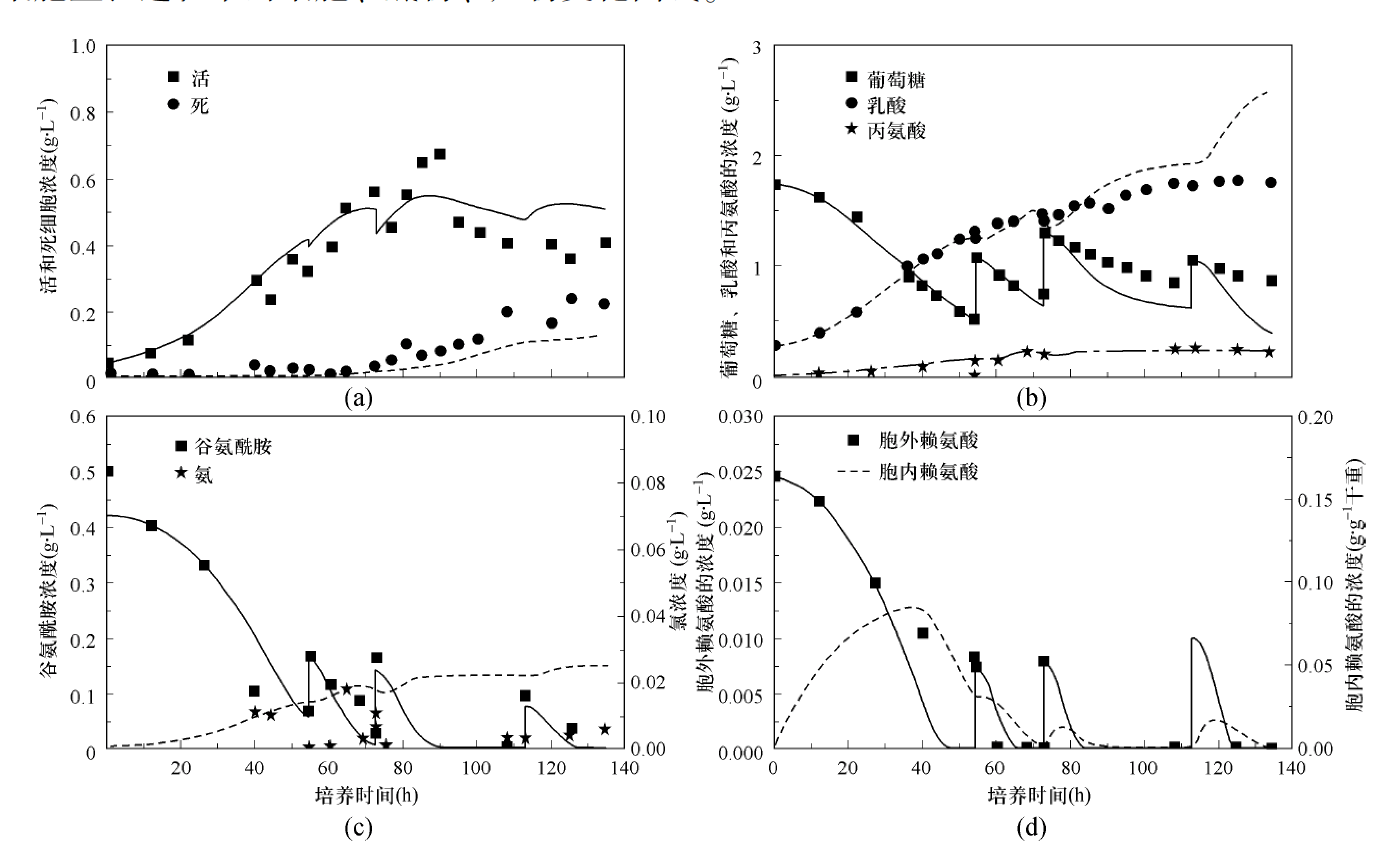


图 5-24　控制论模型对骨髓瘤细胞生长过程的模拟

（a）活细胞和死细胞浓度；（b）葡萄糖、乳酸和丙氨酸浓度；（c）谷氨酰胺和氨浓度；
（d）胞外、胞内赖氨酸浓度。注：实线表示模型模拟值，符号表示实验测定值。

5.3.3　形态结构模型

丝状细菌和真菌的底物利用与产生合成（如抗生素）动力学通常非常复杂。这类细胞生长的特点之一是细胞分化。研究人员 1995 年提出了一个简单易用的形态结构模型（morphologically structured models），模型将细胞分为 3 种类型：顶细胞（apical cells）、分枝细胞（subapical cells）和菌丝细胞（hyphal cells），用分别 a、s、h 表示。菌丝单元的底物吸收和生物量形成只在顶室（a）、分枝室（s）。菌丝单元中，顶室位于尖和隔膜之间。与顶室细胞组成相似的内部细胞（相对于顶部）形成分枝室。模型考虑了 3 种变态反应：分叉、顶尖延伸和分化。在顶尖延伸时，一些顶细胞变成分枝细胞。分叉表示新的顶室由分枝室细胞形成。随着年龄的增长，分枝细胞进一步远离尖形成中空。结果是，分枝细胞远离顶尖，含有大空泡。形成菌丝室的这些细胞在向尖部运送原生质过程具有重要作用。从分枝细胞形成中空的菌丝细胞叫分化。活性的分枝细胞转化成完全的中空菌丝细胞是逐步的。菌丝细胞与分枝室相邻，保持着代谢活性并且与分枝细胞一样具有生长能力。

分枝、顶尖延伸和分化 3 种细胞类型的转换可认为是一级反应，存在下列表达式：

分枝：
$$Z_s \to Z_a,\ u_1 = k_{u_1} Z_s \tag{5-109}$$

延伸：
$$Z_a \to Z_s,\ u_2 = k_{u_2} Z_a \tag{5-110}$$

分化：
$$Z_s \to Z_h,\ u_3 = k_{u_3}\phi_3(c_S) Z_s,\ \phi_3(c_S) = \frac{1}{1 + k_{u_3} c_S} \tag{5-111}$$

式（5-109）～式（5-111）中，Z_a、Z_s 和 Z_h 表示顶细胞、分枝细胞和菌丝细胞在整个细胞中的分率。u_j（$j=1, 2, 3$）为 3 种变态反应的速率，k_{u_j}（$j=1, 2, 3$）为动力学参数。分化受到碳源抑制（如葡萄糖，c_S 为生物相中葡萄糖浓度）。

每种细胞的生长比速率可以通过 Monod 方程表示，表示为

$$\mu_j = k_j \phi(c_S),\ \phi(c_S) = \frac{c_S}{k_S + c_S},\ j = a, s, h \tag{5-112}$$

式（5-111）中，k_j（j = a，s，h）表示每种细胞的最大生长比速率。那么 3 种细胞质量平衡式可为

$$\left.\begin{aligned} r_a^{gen} &= \mu_1 - \mu_2 + \mu_a Z_a \\ r_s^{gen} &= \mu_2 - \mu_1 - \mu_3 + \mu_S Z_S \\ r_h^{gen} &= \mu_3 + f_h \mu_h Z_h \end{aligned}\right\} \tag{5-113}$$

式中，f_h 为具有代谢活性的菌丝细胞的比率（r 为净速率）。

对于 3 种细胞来说，$Z_a + Z_s + Z_h = 1$，则生长比速率的表达式可以写成：

$$\mu = \mu_a Z_a + \mu_S Z_S + f_h \mu_h Z_h \tag{5-114}$$

模型中没有考虑细胞死亡和细胞裂解。这个结构方程中的生长比速率不仅与胞外葡萄糖浓度（c_S）有关，还与 3 种细胞的分率有关（考虑整个细胞量的胞内变量）。式（5-115）中包含了其他两个重要的过程，即葡萄糖（S）吸收和青霉素（P）合成（比速率用 σ_S、ε_P 表示）

$$\sigma_S = \alpha_1\mu + m_S + \alpha_2\varepsilon_P,\ \varepsilon_P = k_2(Z_S + f_h Z_h)c_X,\ c_X = \frac{c_S}{K_2 + c_S + c_{S_2}/K_I} \tag{5-115}$$

式中的参数 α_1、α_2、k_2、K_2、K_I 与 c_S、c_X 和 Z_i（$i = a, s, h$）有关。α_1 是细胞对底物产率系数（$Y_{X/S}$）的倒数。所考虑的 3 种细胞都可以生长，但仅仅是分枝细胞和部分

(f_h) 菌丝细胞可以合成产物，并且 3 种细胞都可以参与不同的变态反应（式（5-109）~式（5-111））。根据以上分析在分批反应、连续反应时，状态变量为 $\boldsymbol{x}=[c_X \quad c_S \quad P \quad Z_S \quad Z_h]^T$，对于流加培养来说，状态变量为 $\boldsymbol{x}=[c_X \quad c_S \quad Z_S \quad Z_h \quad V]^T$，式 $Z_a+Z_S+Z_h=1$ 说明，三部分细胞中只有两部分是独立变量。

5.3.4 遗传结构模型

对于活细胞中运行的各种复杂调控单元，采用数学模型可对其进行定量分析，评价其在胞内不同过程中的相对重要程度。细胞内研究比较透彻的分子水平调控是基因转录的调控，通过建立遗传结构模型（genetically structured model）可以针对某个调控单元进行分析，了解调控对细胞生长和特定的代谢产物的影响。建立基因转录模型的目的是基于启动子的功能对基因转录进行量化。

研究比较透彻的基因转录启动子是乳糖吸收的相关基因调控表达的 *E. coli* lac-启动子。在工业上常用该启动子来强化表达外源基因。lac-操纵子中的 3 个基因编码着 *E. coli* 中的乳糖代谢必须的 3 个酶，即乳糖透性酶、β-半乳糖苷酶、硫代半乳糖苷转乙酰基酶。控制方式主要有 2 种（图 5-25）：①抑制蛋白的控制；②碳代谢产物对启动子的抑制。

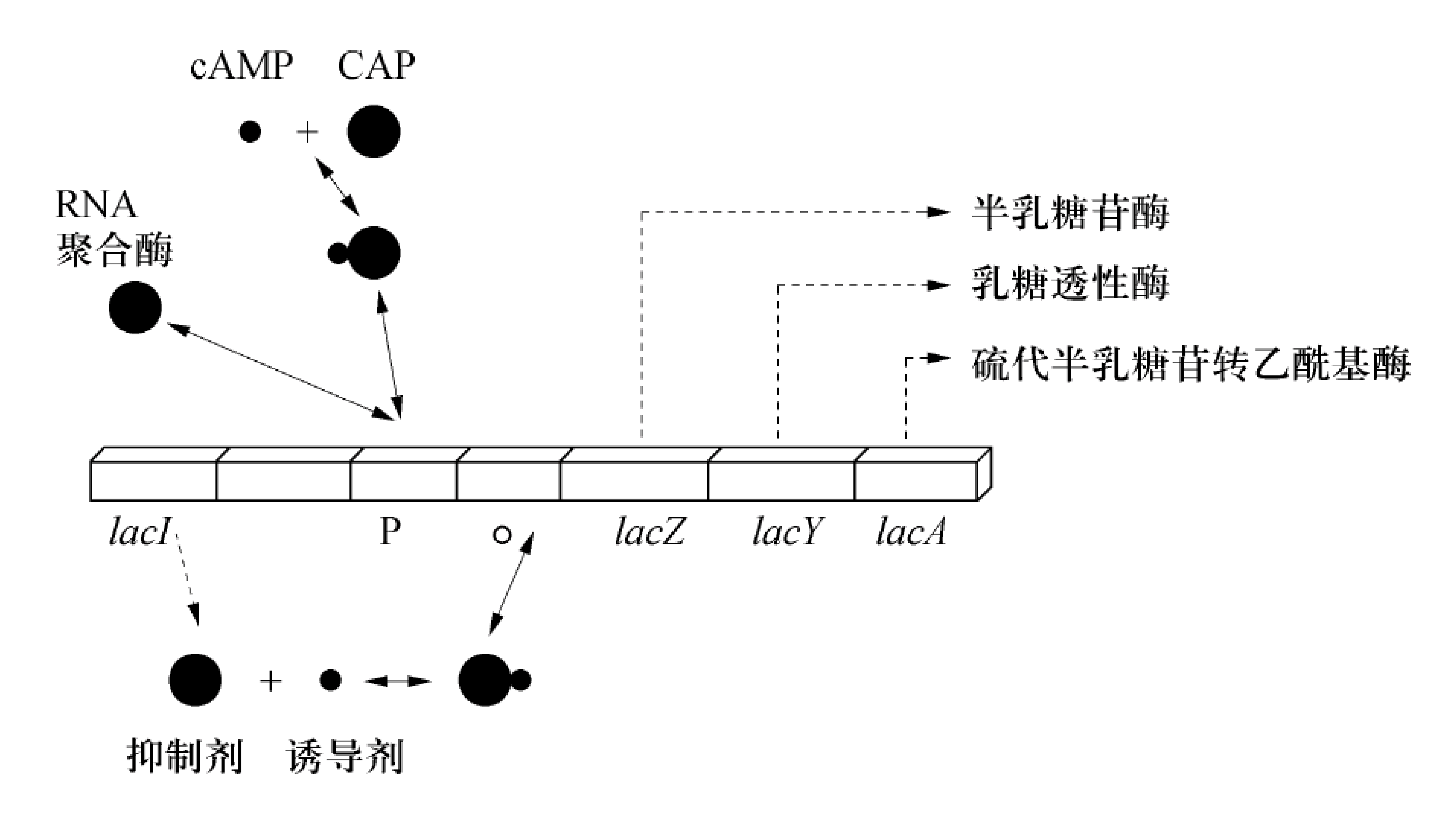


图 5-25 大肠杆菌中的乳糖操纵子

抑制蛋白 X_r 有两个结合位点：①与启动子（X_0）的特异性结合位点；②与乳糖（S_{lac}）的结合位点。当抑制蛋白与乳糖结合后结构改变，与启动子的亲和力大大降低，RNA 聚合酶催化的基因转录可以进行。乳糖在该过程中起到了诱导子的作用，即除非乳糖参与，否则 3 个基因都不表达。抑制蛋白与乳糖及启动子结合的反应如下式：

$$X_r + nS_{lac} \overset{K_1}{\rightleftharpoons} X_r nS_{lac} \tag{5-116a}$$

$$X_0 + X_r \overset{K_2}{\rightleftharpoons} X_0 X_r \tag{5-116b}$$

$$X_0 X_r + nS_{lac} \overset{K_3}{\rightleftharpoons} X_0 X_r nS_{lac} \tag{5-116c}$$

$$X_0 + X_r nS_{lac} \overset{K_4}{\rightleftharpoons} X_0 X_r nS_{lac} \tag{5-116d}$$

式中，n 为乳糖与抑制蛋白的结合位点数。

式（5-116）中给出了操纵子转录系统的简单数学描述，各反应的反应平衡常数可表示为

$$K_1 = \frac{c_{(X_r nS_{lac})}}{c_{X_r} c_{S_{lac}}^n} \tag{5-117}$$

$$K_2 = \frac{c_{(X_0 X_r)}}{c_{X_0} \cdot c_{X_r}} \tag{5-118}$$

$$K_3 = \frac{c_{(X_0 X_r nS_{lac})}}{c_{(X_0 X_r)} \cdot c_{S_{lac}}^n} \tag{5-119}$$

$$K_4 = \frac{c_{(X_0 X_r nS_{lac})}}{c_{X_0} \cdot c_{(X_r nS_{lac})}} \tag{5-120}$$

式（5-117）～式（5-120）基于以下的假设：①宏观描述可以表示反应物对动力学的影响，即使用不同组分浓度。然而，每个微生物细胞中一种类型的启动子仅仅含有几个（1～4），每个细胞中抑制蛋白量也很低（10～20）。对于这样小量的体系，浓度和热力学平衡的意义值得商榷，或许采用随机模型更加恰当。②如同酶反应的米氏方程动力学，所有反应假定为平衡反应。该假设是合理的，因为平衡的弛豫时间比细胞中大部分反应的要短很多。

对抑制蛋白、启动子、诱导物进行物料衡算：

$$c_{X_{rt}} = c_{X_r} + c_{(X_r nS_{lac})} + c_{(X_0 X_r)} + c_{(X_0 X_r nS_{lac})} \tag{5-121}$$

$$c_{X_{0t}} = c_{X_0} + c_{(X_0 X_r)} + c_{(X_0 X_r nS_{lac})} \tag{5-122}$$

$$c_{S_{lact}} = c_{S_{lac}} + nc_{(X_r nS_{lac})} + nc_{(X_0 X_r nS_{lac})} \tag{5-123}$$

式中，下标 t 表示总浓度。

在野生型 *E. coli* 中，有 10～20 倍的抑制蛋白与启动子对应，在这种情况下，式（5-121）中后面两项就可以忽略。另外，如诱导子和抑制蛋白复合物与启动子结合较弱，式（5-122）中 $c_{(X_0 X_r nS_{lac})}$ 可以忽略；最后，式（5-123）中，可以通过假设胞内诱导子分子浓度远远高于抑制蛋白分子，并且可用 $nc_{(X_r nS_{lac})} + nc_{(X_0 X_r nS_{lac})} \ll c_{S_{lac}}$ 来进行简化。通过这些简化，未结合抑制子的启动子（自由启动子）分率可表示为：

$$Q_t = \frac{c_{X_0}}{c_{X_{0t}}} = \frac{1 + K_1 c_{S_{lac}\,t}^n}{1 + K_1 c_{S_{lac}\,t}^n + K_2 c_{X_{rt}}} \tag{5-124}$$

因为操纵子 3 个基因的转录可能通过自由启动子分率来测定，在葡萄糖和乳糖为底物的二次生长的结构模型中，式（5-124）对描述相关酶的合成很有价值。诱导子浓度 S_{lac} 可能与胞外乳糖浓度相关，同时总抑制蛋白浓度可以认为是常数。

5.4　固态发酵微生物反应动力学

固态发酵（SSF）已经具有几千年的历史，由于固态发酵具有节水、节能的独特优势，逐步得到世界各国的重视。固态发酵在工艺上已从传统的粗放的固态发酵发展成为纯种规模化培养，在应用范围上不仅用于传统食品发酵，现在生物技术已经将其扩展到酶制剂、有机酸、色素、芳香物质、饲料、抗生素、乙醇、生物农药和基因工程重组药物等的生产。固态发酵已经成为现代发酵工程研究的一个重要组成部分。

5.4.1　固态发酵微生物的特点

细菌参与的固态发酵过程主要是传统自然发酵过程和食品发酵工业，如日本的“纳

豆”，但是近年来在严格无菌条件下，细菌被越来越多地用于固态发酵过程，如利用芽孢杆菌发酵麸皮生产淀粉酶等。酵母菌的情况与细菌类似，目前利用酵母菌纯种固态发酵果皮及其他固体废弃物生产乙醇受到人们广泛重视。

固态发酵的最佳微生物是丝状微生物即真菌和放线菌。自然条件下的丝状真菌可以在缺乏自由水的固态底物上生长良好，菌丝可以穿入细胞间或细胞内的空隙更好地利用底物，有研究者认为这种穿透作用可能是由于机械和酶两种机制产生的。图 5-26 为固态发酵时菌丝在基质颗粒表面生长的模型：①酶释放，只发生在基质/菌体界面上；②糖化酶在扩散基质颗粒内部的扩散；③糖化酶水解淀粉；④葡萄糖的释放以及在基质颗粒内的扩散；⑤葡萄糖在生物膜内的扩散并被菌体吸收；⑥O_2 扩散并被菌体吸收；⑦菌体生长导致生物膜向外扩张。

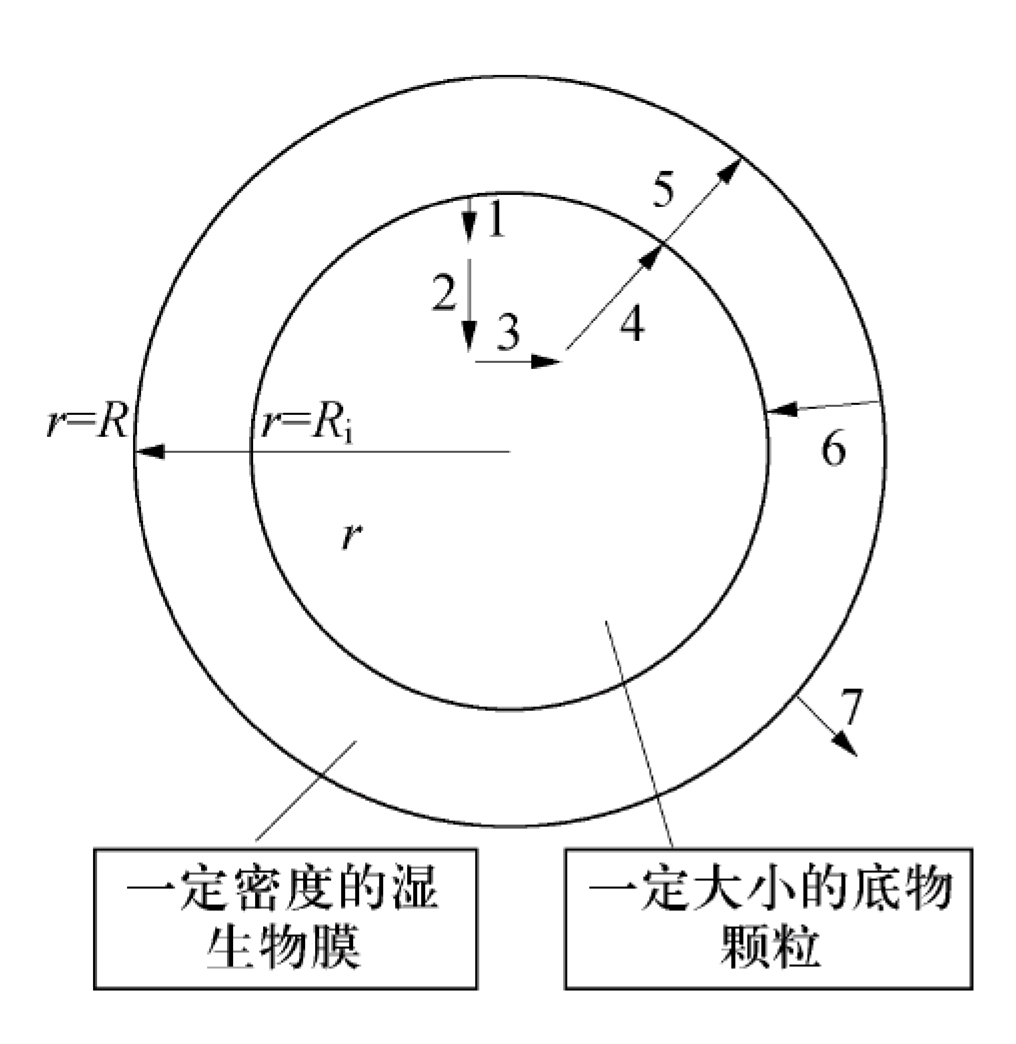


图 5-26　固态发酵时菌丝在基质颗粒表面的生长模型

常见的固态发酵微生物一般具备下面几个特征：①能够利用多糖的混合物；②有完整的酶系，可以迅速从对某种多糖的代谢转为对另一种多糖的代谢；③能够深入到固态物料层中，也能穿入基质细胞内；④在发酵过程中以菌丝形式生长，不易孢子化；⑤生长迅速，染菌概率低；⑥可以在含水量低的基质中生长；⑦能够耐受高浓度的营养盐；⑧可以耐受基质预处理时产生的苯类有毒物质。

5.4.2　固态发酵菌体生长模型

1. 固态发酵菌体量的测定　菌体生长量及产物测定一直是固态发酵中重要的研究内容及技术难点之一，菌体生长的好坏从不同侧面反映了固态发酵过程参数控制的结果。造成固态发酵动力学研究进展不快的一个重要原因是对其进行参数检测比较困难，其中尤以菌体含量的检测最为困难。因为没有游离水，要想将在潮湿固态基质上生长的菌体分开是很困难的。常用的表征菌体量的方法有：

麦角甾醇：这是许多真菌细胞膜上主要的固醇类物质，但植物原料中却没有，可以用 GC、HPLC 或 UV 光谱测定；

葡萄糖胺：这是几丁质水解产生的，许多真菌的细胞壁中含有，植物原料中没有。水解细胞，采用 HPLC 测定。

蛋白质：是细胞的主要成分，但是植物原料中也存在。由于不能准确确定细菌和植物蛋白的比例，该方法只能用于植物原料中蛋白质量很少的情况下。

还有采用其他菌体组分表征菌体量的方法，如 ATP、壳多糖、核酸等。

采用活性变化也可以表征菌体量，如酶活力、呼吸速率、CO_2 释放等。利用光反射镜，监视床层颜色的变化来预测菌体生长情况，例如用黑曲霉生产曲酸时，由于菌体生长，床层颜色逐渐变为棕色，将颜色变化与菌体生长情况相关联，可确定菌体变化情况。

2. 固态发酵菌体生长模型　由于固态发酵反应器内的不均一性，即使只考虑平衡和传质，过程模型也非常复杂。固定床内温度、湿度、气相中 O_2 浓度都存在显著的梯度，相应的平衡方程不得不采用偏微分方程，这比混合良好体系中的微分方程建立和计算都要复杂；在颗粒内部，酶、水解产物和 O_2 同样存在扩散效应，过程极其复杂。另外，模型参数的求取需要大量微尺度上的实验。固态发酵中只有一种情况例外——气固流化床，这种反应器提供了一个良好的混合和传质的微环境。

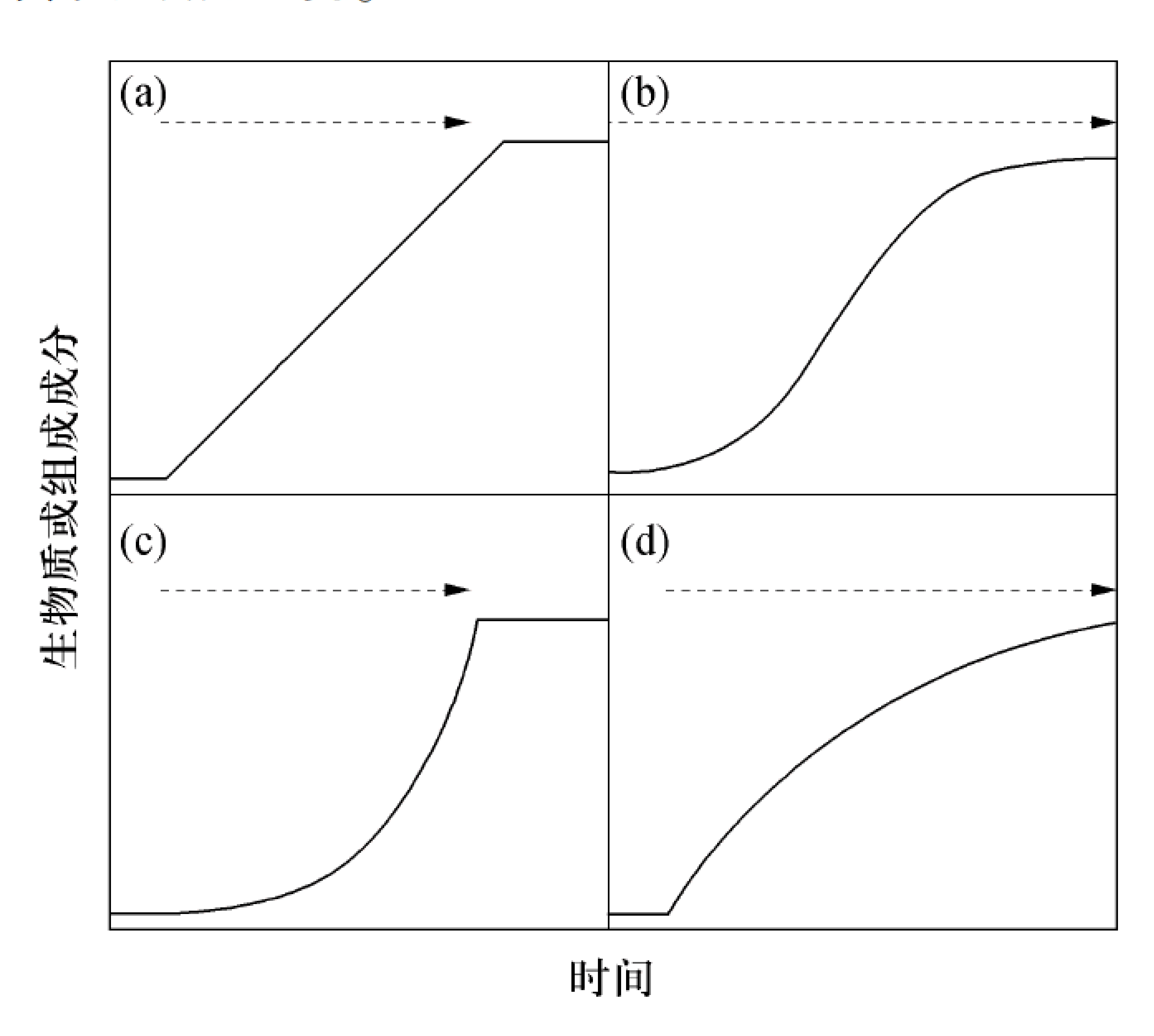


图 5-27　固态发酵过程中几种典型的动力学曲线

（a）线性；（b）Logistic；（c）指数；（d）快速增加、慢速减少

（t_0 自迟滞期结束开始计算）

大多数微生物固态发酵过程模型都是简单的经验动力学模型，如图 5-27 所示，主要包括线性模型（A）、指数模型（B）、Logistic 模型（C）、快增速慢减速模型（D）。描述这些过程的经验方程见表 5-11。两阶段模型中 t_a 为快速增加期结束的时间，L 为减速期开始时的比生长速率与增速期比生长速率的比值，该方程应用时最大的困难是对数期比较短，生物量较小，很难确定，可将 μ 和 L 合成 μL 进行测定与运算。这些方程中没有包括底物浓度，否则要考虑颗粒的扩散过程。

表 5-11　SSF 系统中微分和积分形式的经验生长方程

名　称	方　　程	参　数	积　分　式
线性模型	$\frac{dc_X}{dt}=K$	K	$c_X=Kt+c_{X_0}$
指数模型	$\frac{dc_X}{dt}=\mu c_X$	μ	$c_X=c_{X_0}e^{\mu t}$
Logistic 模型	$\frac{dc_X}{dt}=\mu c_X\left(1-\frac{c_X}{c_{X_m}}\right)$　（5-125）	c_{X_m}	$c_X=\frac{c_{X_m}}{1+((c_{X_m}/c_{X_0})-1)e^{-\mu t}}$　（5-126）

续表

名　称	方　　程	参　数	积　分　式
两阶段模型	$\frac{dc_X}{dt}=\mu c_X, t<t_a$ $\frac{dc_X}{dt}=(\mu L e^{-k(t-t_a)})c_X, t\geqslant t_a$　（5-127）	μ，L，k，A	$c_X=c_{X_0}e^{\mu t}, t<t_a$ $c_X=c_{X_a}\exp\left[\frac{\mu L}{k}(1-e^{-k(t-t_a)})\right], t\geqslant t_a$　（5-128）

注：c_X 表示微生物量；t 表示时间；K 表示线性生长速率常数；μ 表示比生长速率；c_{X_0} 表示初始生物量；c_{X_m} 表示最大可能的生物量。

在以上模型中，logistic 模型是最常用的一种，该模型简单易用，同时也可比较好的模拟固态发酵的整个过程，包括迟滞期和发酵后期的生长停止。其他模型往往需要对不同阶段分别建立方程。

3. 环境条件对菌体生长的影响　建立反应器条件的模型的目的是将反应器中的环境条件描述为时间的函数，并考虑微生物对这些条件的响应。模型中，两个最重要的环境变量是温度和床体的水活度，这些变量可以通过反应器操作来调节。可以通过固定其他因素进行实验的方式来建立环境条件模型，环境因素变量设定不同值时进行一系列培养，培养过程条件恒定，分析该条件下动力学模型的参数准确值。

研究人员对 Logistic 模型进行研究后，考虑温度对细胞生长的影响，提出如下模型：

$$\mu_T = A\exp\left(\frac{-E_{a_1}}{R(T+273)}\right)\Bigg/\left\{1+B\left(\frac{-E_{a_2}}{R(T+273)}\right)\right\} \quad (5\text{-}129)$$

式中：A（h^{-1}）；B 无因次；E_{a_1} 和 E_{a_2}（$J\cdot mol^{-1}$）为参数；R 为气体常数（$J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$）；$\mu_T$ 为比生长速率；T 为温度（℃）。

$$c_{X_m}=a_0+a_1T+a_2T^2+a_3T^3+a_4T^4 \quad (5\text{-}130)$$

式中：$a_0\sim a_4$ 为拟合参数；T 为温度（℃）。

研究人员采用表示物理状态的参数 Q 对 Logistic 模型进行了修正：

$$\frac{dc_X}{dt}=\mu c_X\left(1-\frac{c_X}{c_{X_m}}\right)\left(\frac{Q}{1+Q}\right) \quad (5\text{-}131)$$

$$\frac{dQ}{dt}=f(T,\ a_W,\ Q) \quad (5\text{-}132)$$

4. 固态发酵菌体死亡的动力学过程　由于固态发酵系统涉及的主要是丝状真菌，对其死亡的测定比单细胞生物更加困难，所以有关研究较少。如果菌体死亡定义为失去生长能力，那么死亡就并不一定导致自溶，也不会导致生物量的减少。固态发酵系统的菌体死亡模型非常简单，研究人员将菌体分为两部分，菌体死亡符合一级动力学：

$$\frac{dc_{X_V}}{dt}=\mu_G c_{X_V}\left(1-\frac{c_{X_V}+c_{X_D}}{c_{X_m}}\right)-k_D c_{X_V} \quad (5\text{-}133)$$

$$\frac{dc_{X_D}}{dt}=k_D c_{X_V} \quad (5\text{-}134)$$

式中：c_{X_V} 表示活细胞浓度；c_{X_D} 表示死细胞浓度；μ_G 表示真实比生长速率；k_D 表示死亡比速率。

研究人员进一步提出了包含两个 Arrhenius 类型因子的表观生长比速率：

$$\mu_{obs} = \mu_G - k_D = \mu_{G_0} \exp\left(1 - \frac{E_{a_G}}{RT}\right) - k_{D_0} \exp\left(\frac{E_{a_D}}{RT}\right) \tag{5-135}$$

式中：μ_{G_0} 和 k_{D_0} 为菌体生长和死亡的比速率常数，E_{a_G} 和 E_{a_D} 是菌体生长和死亡的活化能。

5.4.3　固态发酵基质消耗模型

微生物在固体基质表面生长时，必然伴随着干重的减少，如图 5-28 所示。

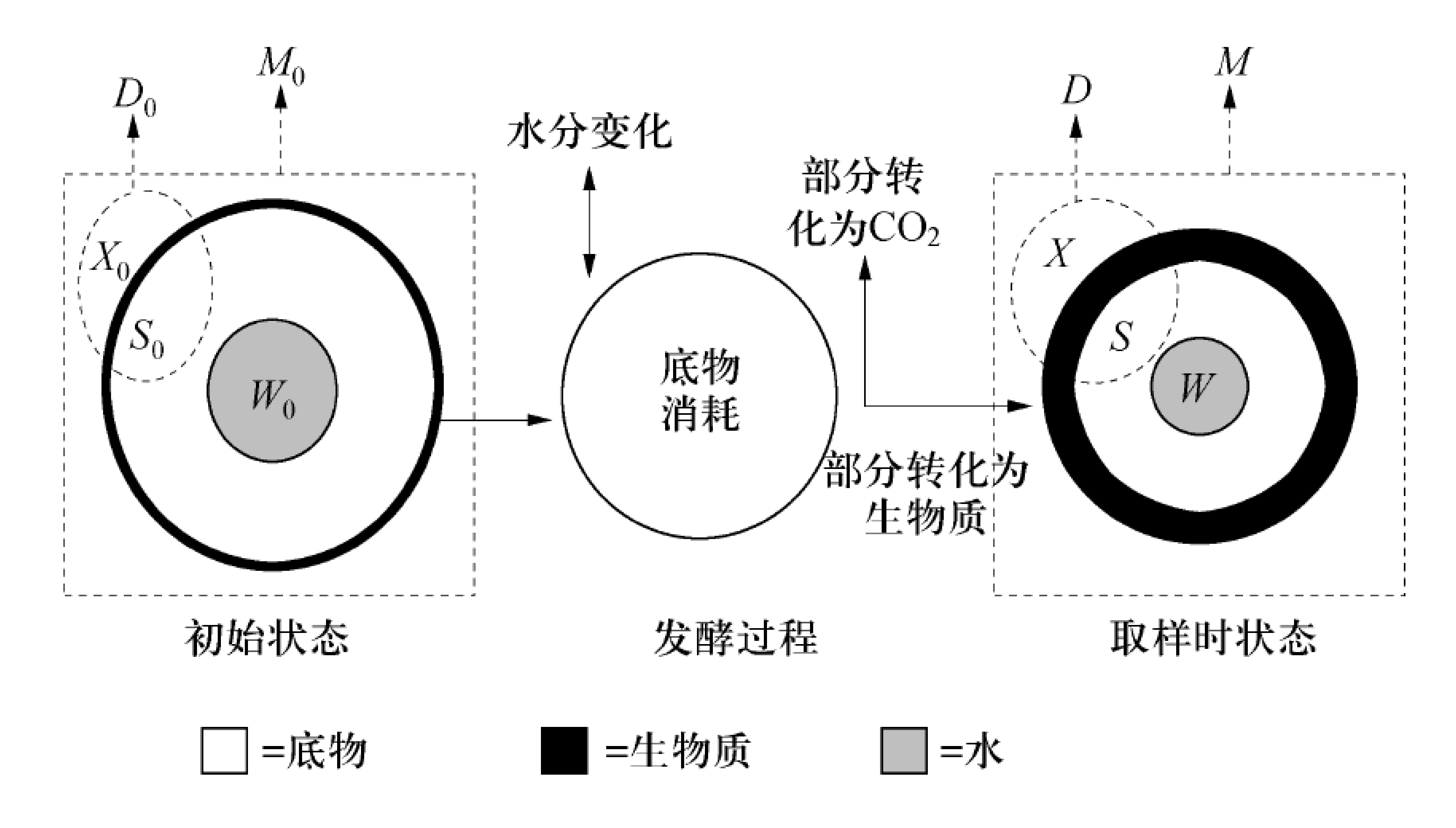


图 5-28　固态发酵时菌丝生长、基质消耗、基质颗粒中水分减少过程

考察生物量与基质之间的关系存在：

$$D = X + S \tag{5-136}$$

$$c_{XR} = \frac{生物量}{样品干重} = \frac{X}{D} = \frac{X}{X+S} \tag{5-137}$$

$$c_{XA} = \frac{生物量}{样品初始时的干重} = \frac{X}{D_0} = \frac{X}{X_0+S_0} \tag{5-138}$$

式中：X 表示生物量干重；D 表示固体总干重；S_0 表示初始基质干重；S 表示残留基质干重。

对于反应器中总的细胞量，以接种时干重和取样时干重计，存在：

$$\frac{dX}{dt} = \frac{d\ (c_{XA}D_0)}{dt} = D_0\frac{dc_{XA}}{dt} \tag{5-139}$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{d\ (c_{XR}D)}{dt} = D\frac{dc_{XR}}{dt} + c_{XR}\frac{dD}{dt} \tag{5-140}$$

式中：c_{XA} 为菌体量与初始样品量 D_0 比值；c_{XR} 为菌体量与取样时样品量 D 的比值。

残留基质干重与生物速率之间的关系为

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt} - m_S X \tag{5-141}$$

考虑式（5-136），有

$$\frac{dD}{dt} = \frac{dX}{dt} + \frac{dS}{dt} \tag{5-142}$$

代入式（5-141），得

$$\frac{dD}{dt} = \left(1 - \frac{1}{Y_{X/S}}\right)\frac{dX}{dt} - m_S X \tag{5-143}$$

采用浓度方式表示，有

$$\frac{\mathrm{d}D}{\mathrm{d}t}=D_0\left[\left(1-\frac{1}{Y_{\mathrm{X/S}}}\right)\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{XA}}}{\mathrm{d}t}-m_{\mathrm{S}}c_{\mathrm{XA}}\right] \tag{5-144}$$

5.5 微生物致死和过滤动力学

5.5.1 高温灭菌动力学

灭菌（除菌）是现代发酵工艺中的一个重要环节，各种纯培养过程都要求在没有杂菌污染的条件下进行。由于培养过程中通常含有比较丰富的营养物质，培养周期长，比较容易受到杂菌的污染，进而会产生各种不良后果。因此培养基的灭菌必须合理地设计，使之既能达到所需要的无菌程度，又能保证培养基中有效成分的破坏在允许的范围之内。

培养基的灭菌指从培养基中杀灭（或从中除去）有生活能力的细菌营养体及其孢子。工业规模上的液体培养基灭菌，杀灭杂菌比除去杂菌更为常用，其中热灭菌法最为简便、有效和经济。培养基灭菌程度的要求应根据所服务的发酵系统而异。绝对的无菌，不是不可能的，而是不合理的。

对于液体培养基的热灭菌，工程上所要解决的课题是将培养基中的杂菌总数 N_0 杀灭到可以接受的总数 N，需要多高的温度、多长的时间？这取决于杂菌孢子的热灭死动力学、反应器的型式和操作方法，还决定于培养基中有效成分受热破坏的可接受范围。

1. 灭菌动力学及影响因素

1）微生物的热死定律——对数残留定律

微生物受热死亡遵循分子反应速率理论。在化学反应中，某些分子的分解和分子内部的重新排列的反应属于一级反应。杂菌是一个复杂的高分子体系，其受热致死是因蛋白质变性，这种反应也属于一级反应。因此活的杂菌细胞（包括芽孢）在一定温度下受热致死的过程与一级化学反应中未反应分子的减少速度类似，即存活细胞与未反应分子等价，微生物个数减少的速度与任一瞬间残存的菌数成正比，也属于一级反应。

$$\mathrm{d}N/\mathrm{d}t=-k_{\mathrm{D}}N \tag{5-145}$$

式中：N 为任一时刻的培养基中活细菌浓度（cell · L^{-1}）；t 为时间（min）；k_{D} 为比热死速率常数（min^{-1}）。上式积分得：

$$N=N_0e^{-k_{\mathrm{D}}t}, \tag{5-146}$$

$$t=\frac{1}{k_{\mathrm{D}}}\ln\frac{N_0}{N_t} \tag{5-147}$$

式中：N_0 为培养基中初始总活菌数；N_t 为灭菌至 t 时刻残留活菌数。

式（5-145）~式（5-146）即对数残留定律。可以根据残留菌数 N 的要求计算灭菌时间 t。利用此定律进行灭菌过程设计时需要考虑：①污染程度（N_0），培养基中有各种各样的微生物，不可能逐一考虑，如果将所有微生物作为耐热的芽孢来计算灭菌的温度和时间，将大大延长时间并提高温度，因此一般只考虑芽孢细菌和细菌芽孢数之和作为计算依据较合理；②灭菌程度（N_t），即残留菌数，在发酵工程中又称染菌概率，根据上式，如果要达到 N_t 为 0，则要求灭菌时间趋于无穷。实际过程中没有必要。一般采用 $N_t=0.001$，即 1000 次灭菌中有一次失败。

可以通过微生物灭菌过程残留曲线来考察微生物对热的耐受能力。以菌的对数残留数 $\ln(N_t/N_0)$ 对时间 t 作图，如图 5-29 所示，残留曲线斜率即为式中的 $-k_D$。实际过程中某些微生物受热死亡的速率不符合对数残留定律，图 5-30 所示为嗜热脂肪芽孢杆菌的芽孢在不同温度下的死亡曲线。呈现热死亡非对数动力学的主要原因是一些微生物芽孢的存在。研究人员所提出的菌体循序死亡模型可以比较好地说明这种菌体死亡动力学行为。该模型假设耐热微生物芽孢的死亡不是突然的，而是渐变的，需要经历一中间过程后才会死亡。

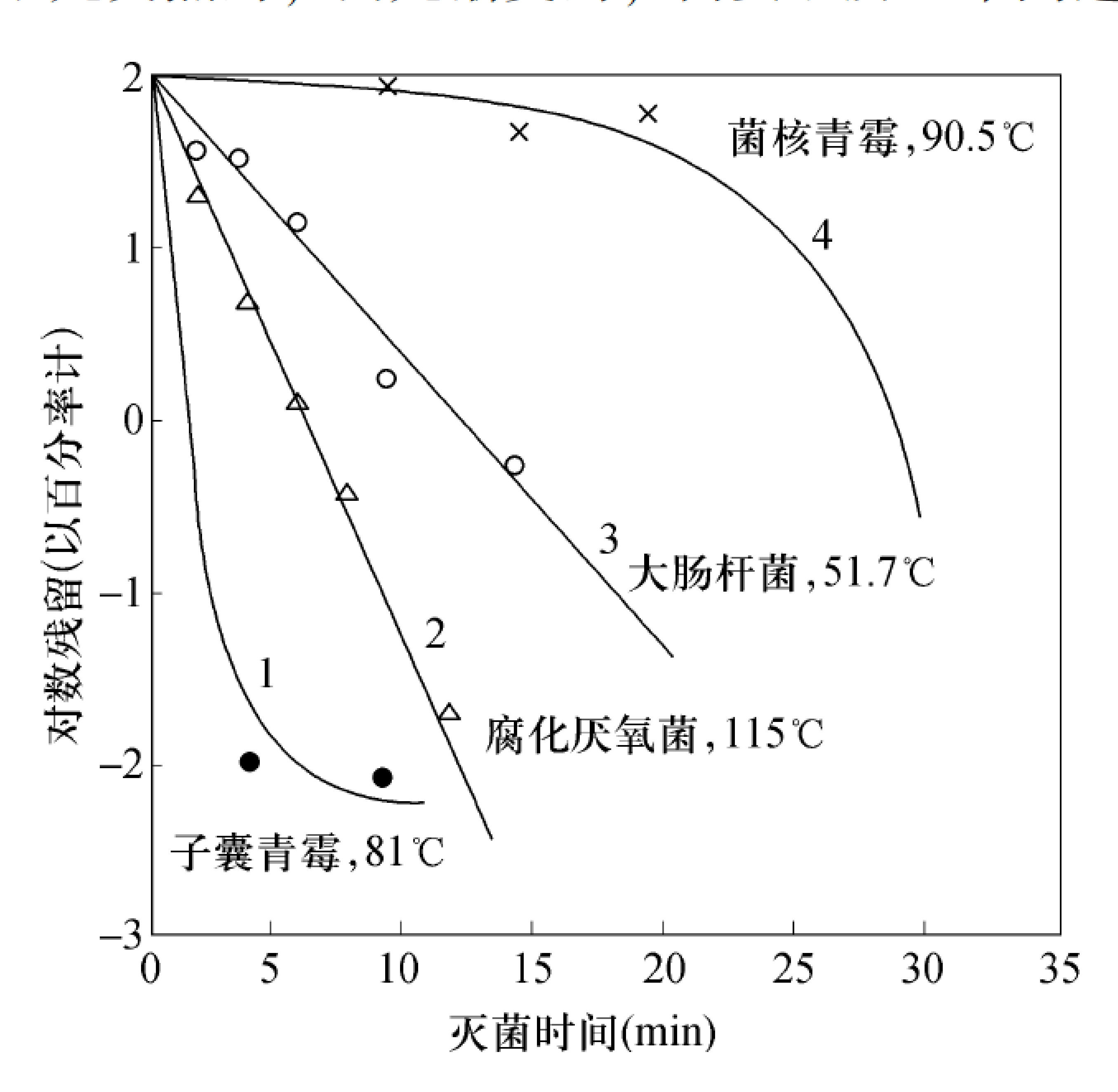


图 5-29　部分微生物的热死残留曲线

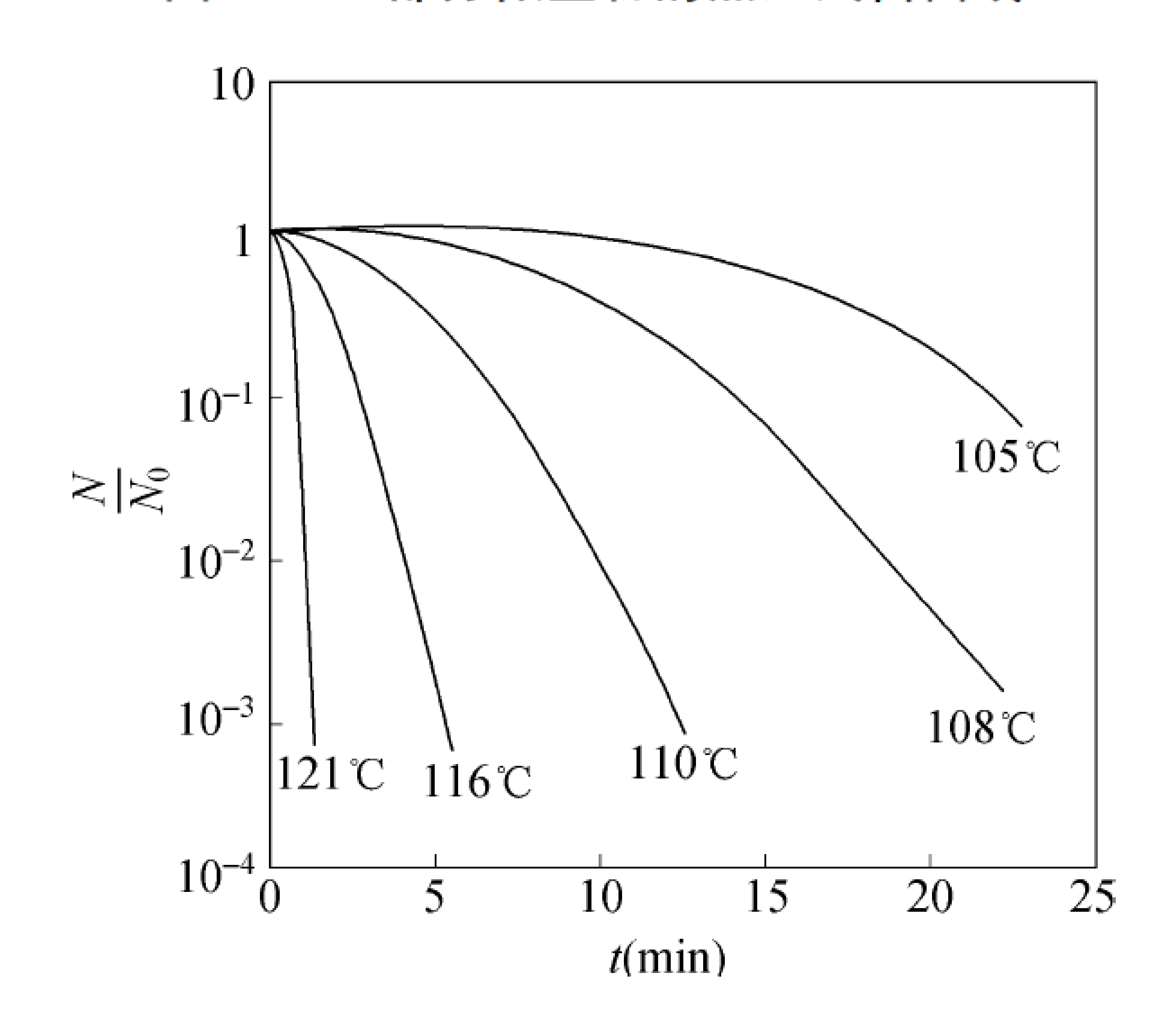


图 5-30　嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢在不同温度下的死亡曲线

2）影响灭菌效果的主要因素

温度、时间、微生物性质是影响灭菌效果的主要因素，并相互关联。其他还包括培养基状态、灭菌工艺、操作方式等。

（1）热阻：不同微生物对热的耐受能力不一样。能杀死微生物的最低温度称为致死温度，在此温度下杀死所有微生物所需要的时间称致死时间。微生物对热的抵抗力常用“热阻”表示，是指微生物在某一特定条件下的致死时间。表 5-12 为部分微生物的相对热阻。

表 5-12　部分微生物的相对热阻

大肠杆菌	细菌芽孢	霉菌孢子	病毒与噬菌体
1	3×10^6	2～10	1～5

（2）温度：微生物的热灭死接近于化学反应的一级反应动力学。它的比热灭死速率常数 k_D 与灭菌温度 T 的关系，实验表明，可用 Arrhenius 方程来表征，即

$$k_D = Ae^{-\Delta E/RT} \tag{5-148}$$

式中：k_D 为菌体死亡速率常数（min^{-1}）；A 为 Arrhenius 常数（min^{-1}）；R 为气体常数（$J\cdot mol^{-1}\cdot K$）；T 为热力学温度（K）；ΔE 为杀死菌体所需的活化能（$J\cdot mol^{-1}$）。

培养基中的有效成分的热分解同样为一级反应，符合对数残留定律。培养基灭菌既要杀死杂菌的芽孢，又要保存其中的有效成分。试验表明，细菌芽孢热灭死反应的 ΔE 很高，而一般而言培养基中的有效成分热破坏反应的 ΔE 较低。表 5-13 列出了某些细菌芽孢受热死亡和培养基中营养成分受热分解时的活化能数据。将 T 提高到一定程度会加速细菌芽孢的灭死速度，从而缩短在升高温度下的灭菌时间；由于培养基有效成分热破坏的 ΔE 很低，上述的温度提高只能稍微增大其热破坏速度，但由于灭菌时间的显著缩短，其结果是有效成分的破坏量反而大为减少。这就是通常所说的“高温快速灭菌法”。高温短时间灭菌既能快速地灭菌，又能有效地保存培养基中的营养成分。

表 5-13　部分微生物、营养物质、酶的反应热灭活反应活化能

类　别	名　　称	活化能（$kJ\cdot mol^{-1}$）
芽孢	脂肪嗜热芽孢杆菌	287.2
	枯草芽孢杆菌	318.0
	肉毒杆菌	343.1
营养物质	维生素 B_{12}	96.6
	维生素 B_6（吡多辛）	92
	维生素 B_2（核黄素）	98.7
	叶酸	70.2
	泛醇	87.8
	葡萄糖	100.5
酶	胰蛋白酶	170.5
	过氧化物酶	98.7
	胰脂肪酶	192.3
反应	美拉得反应	130.5

例 5-2　灭菌温度为 120℃，试比较嗜热脂肪芽孢杆菌死亡速率常数 k_S 和维生素 B_1 的分解速率常数 k_B。如果温度提高的 150℃，k_S 和 k_B 又如何变化。

解　已知嗜热脂肪芽孢杆菌的活化能 $\Delta E_S = 283460 J\cdot mol^{-1}$，维生素 B_1 活化能 $\Delta E_B = 92114 J\cdot mol^{-1}$，Arrhenius 常数 $A = 1.06\times10^{36}$（min^{-1}），气体常数 $R = 8.314$（$J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$）

代入式（5-148）中得

在 120℃时：

$$k_S = 1.06 \times 10^{36} \times e^{\frac{283460}{8.314 \times 393}} = 0.024\ (\mathrm{min}^{-1})$$

$$k_B = 1.06 \times 10^{36} \times e^{\frac{92114}{8.314 \times 393}} = 0.055\ (\mathrm{min}^{-1})$$

在 150℃时：

$$k_S = 1.06 \times 10^{36} \times e^{\frac{283460}{8.314 \times 423}} = 11.12\ (\mathrm{min}^{-1})$$

$$k_B = 1.06 \times 10^{36} \times e^{\frac{92114}{8.314 \times 423}} = 0.404\ (\mathrm{min}^{-1})$$

可见从 120℃升高到 150℃时，芽孢 k_S 值从 0.024min^{-1}增加至 11.12min^{-1}，为原来的 63 倍，但同样的温度变化，维生素 B_1 的 k_B 值只从 0.55 增加到 0.404，仅为原来的 7.3 倍。

例 5-3　有发酵培养基 40m^3，原始污染程度为 10^5 个菌/ml，要求无菌程度 N_t 为 10^{-3}个菌/批，若灭菌温度 125℃时灭菌速度常数为 1min^{-1}，求所需要的灭菌时间。

解　已知培养基中总菌数为：

$N_0 = 40 \times 10^6 \times 10^5 = 4 \times 10^{12}$个菌/批

$N_s = 10^{-3}$个菌/批

$k_D = 1\mathrm{min}^{-1}$

将上述数据代入方程 $t = \frac{1}{k_D}\ln\frac{N_0}{N_t}$，得

$$t = \frac{1}{1}\ln\frac{4 \times 10^{12}}{10^{-3}} = 20.8\mathrm{min}$$

2. 间歇灭菌的设计计算　间歇灭菌又叫分批灭菌或实罐灭菌，是将配制好的培养基放在反应器或其他装置中，利用蒸汽对培养基进行加热到高温灭菌。图 5-31 为间歇灭菌温度变化过程曲线，加热过程分为 3 个阶段：加热升温、保温、冷却降温。灭菌过程工艺设计是以传热、菌热灭活为基础的。涉及传热面积、各阶段时间等环节。在实际过程中，由于存在混合、扩散等非理想行为，常需要采用传热模型、扩散模型进行分段计算才能得到准确的结果。

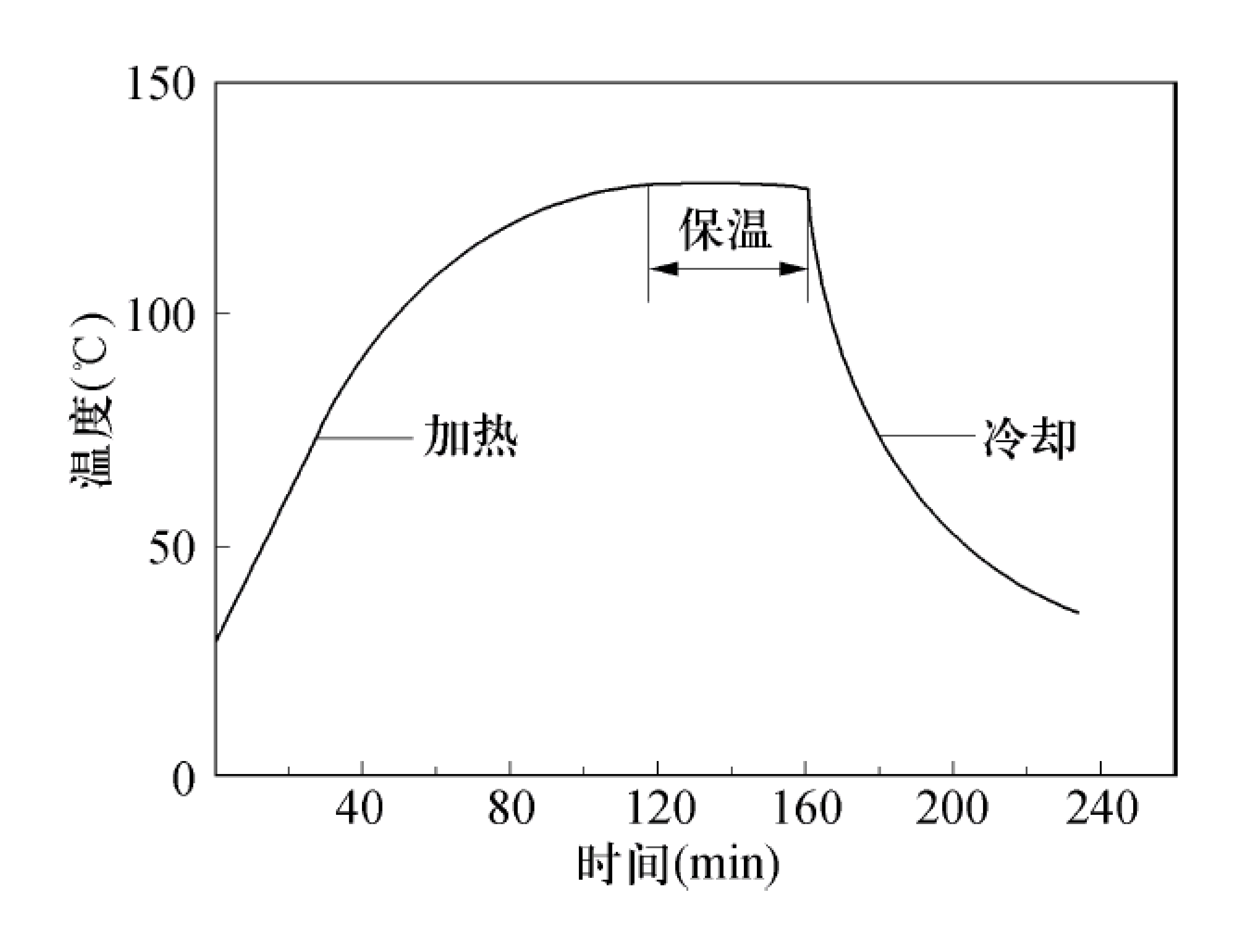


图 5-31　间歇灭菌温度变化过程曲线

分批灭菌过程中，最终残留活菌数和初始菌数可以被写成：

$$\left(\frac{N_f}{N_0}\right)_{total} = \left(\frac{N_1}{N_0}\right)_{heating} \times \left(\frac{N_2}{N_1}\right)_{hold} \times \left(\frac{N_f}{N_2}\right)_{cooling} \quad (5\text{-}149)$$

式中：0、1、2 表示升温、保温、冷却阶段的开始时间；f 表示过程结束时间。

根据式（5-149），Deindoerfer 和 Humphrey 将灭菌的设计准数定义成：

$$\Delta = \ln\frac{N_0}{N} = \int_0^t k_D \mathrm{d}t = k_{D_0}\int_0^t \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\mathrm{d}t \quad (5\text{-}150)$$

则分批灭菌的升温、保温、降温阶段对灭菌效果的影响可以写成：

$$\Delta_{total} = \Delta_{heating} + \Delta_{hold} + \Delta_{cooling} \quad (5\text{-}151)$$

式中，$\Delta_{heating} = k_{D_0}\int_0^{t_1}\exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\mathrm{d}t$，$\Delta_{hold} = k_{D_0}\int_{t_1}^{t_2}\exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\mathrm{d}t$，$\Delta_{cooling} = k_{D_0}\int_{t_2}^{t_f}\exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right)\mathrm{d}t$。

在保温段温度保持恒定，但在升温和降温阶段，温度的变化取决于加热的类型，如直接蒸汽、夹套或是加热盘管加热。表 5-14 为不同加热方式下的温度变化方程。热传递的效率依赖于培养基的特性，如黏度、固体的含量。典型分批灭菌过程需 3～5h，各阶段对灭菌的贡献如下：

$$\Delta_{heating}/\Delta_{total} = 0.2, \quad \Delta_{hold}/\Delta_{total} = 0.75, \quad \Delta_{cooling}/\Delta_{total} = 0.05$$

表 5-14　分批灭菌过程中温度－时间变化方程

加热或冷却类型	温度－时间关系	编　号
直接蒸汽	$T = T_0 + \frac{Hm_S t}{c(M + m_S t)}$	(5-152)
夹套、盘管蒸汽等等温热源	$T = T_H + (T_0 - T_H)\exp\left(-\frac{UAt}{cM}\right)$	(5-153)
电加热等恒速率热源	$T = T_0 + \frac{qTt}{cM}$	(5-154)
冷却盘管等连续非恒温制冷剂	$T = T_{C_0} + (T_0 - T_{C_0})\exp\left\{-\left[1-\exp\left(-\frac{UA}{m_C c}\right)\right]\frac{m_C t}{M}\right\}$	(5-155)

注：A 表示传热面积（m^2）；c 表示培养基比热（$kcal \cdot kg^{-1} \cdot ℃^{-1}$）；$H$ 表示相对于初始培养基温度的热含量；m_S 表示蒸汽质量速率（$kg \cdot s^{-1}$）；M 表示初始培养基质量；q 表示传热速率（$kcal \cdot min^{-1}$）；t 表示时间（min）；T 表示温度（K）；T_0 表示培养基初始温度（K）；T_H 表示热源温度（K）；T_{C_0} 表示制冷剂初始温度（K）；U 表示综合传热系数（$kcal \cdot m^{-2} \cdot min^{-1} \cdot ℃^{-1}$）；$m_C$ 表示制冷剂质量速率（$kg \cdot s^{-1}$）。

3. 连续灭菌动力学与过程设计　连续灭菌指将配制好的培养基在向反应器输送的同时进行加热、保温和冷却而进行灭菌的过程。间歇灭菌的一个缺点是对蒸汽要求不平稳，在升温阶段需要有足量的蒸汽以使升温阶段足够短，而连续灭菌可以很容易避免这点。另外，连续灭菌还具有很多优点，如操作条件稳定、灭菌质量高、易于自动控制、热效率高、设备利用率高等。根据升温阶段加热工艺的不同，可分为 2 种工艺：直接加热工艺和间接加热工艺（图 5-32）。

第一阶段：直接加热比间接加热效率高，加热时间几乎可以忽略不计。对于间接加热，常用两种加热器：板框加热器和管壳式加热器。板框加热器更加有效，因为传热面积较大，对高黏度培养基也比较合适，但由于结构问题加热压力较低（通常小于 20atm）。

若培养基采用等温加热，温度变化可以用下式表示：

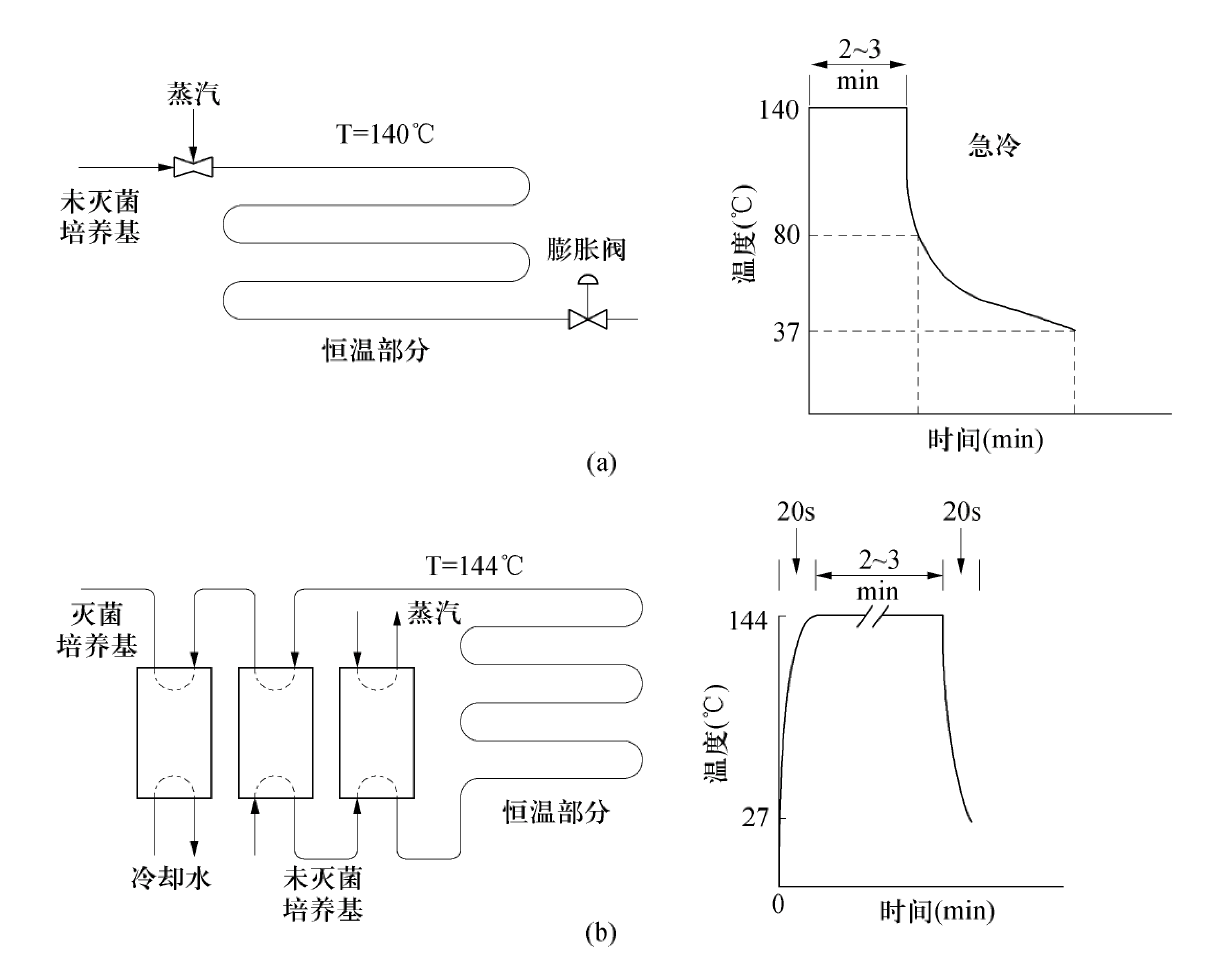


图 5-32 两种连续灭菌工艺

（a）直接蒸汽喷射加热和温度变化过程；（b）平板或螺旋板换热器加热和温度变化过程

$$T_{C_2} = T_H - (T_H - T_{C_1})\exp\left(-\frac{UA\,\overline{\tau}_{heat}}{cW}\right) \tag{5-156}$$

若采用相同热容量等流速热源逆流加热时，有

$$T_{C_2} = T_{C_1} - \frac{\Delta TUA\,\overline{\tau}_{heat}}{cW} \tag{5-157}$$

式中：T_C 为换热器温度（K）；T_H 为热源温度（K）；U 为综合传热效率（$J \cdot s \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$）；$A$ 为传热面积（m^2）；c 为比热（$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$）；$W$ 为灭菌器中培养基量（kg）；$\overline{\tau}$ 为平均停留时间（s）。

第二阶段：经加热的培养基流过维持管，如果热损失可以忽略，则维持管的温度可认为恒定。该阶段平均停留时间为

$$\overline{\tau}_{hold} = \frac{L}{u} \tag{5-158}$$

则，Δ 因子可以表示为下式：

$$\Delta = \ln\frac{N_0}{N} = K_d\,\overline{\tau}_{hold} = A_0\exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)\overline{\tau}_{hold} \tag{5-159}$$

式中，N_0 是进入维持管的菌数。

如果培养基在维持管中的流动是理想的活塞流，那么所有培养基的停留时间都相同，灭菌程度也一致。然而，由于存在着流体黏性、管壁摩擦、湍流等情况，流动常偏离理想状况：管中心处流速快，而管壁处流速慢。牛顿型流体通过光滑管道时，平均流速与最大流速之比为 $u/u_m = 0.5$；层流变成湍流时，$u/u_m = 0.75$；而当雷诺准数达 106，$u/u_m = 0.86$。所以，

如果使用平均流速计算停留时间时，部分培养基的灭菌可能就没有达到要求，将会造成污染。

由于轴向混合造成偏离理想活塞流，可以采用扩散模型描述，如图 5-33 所示。结合微生物的受热死亡动力学，对维持管长度为 dx 的微元体积进行有关菌体的物料衡算，可表示为：

（进入）－（流出）－（受热死亡）＝（积累）

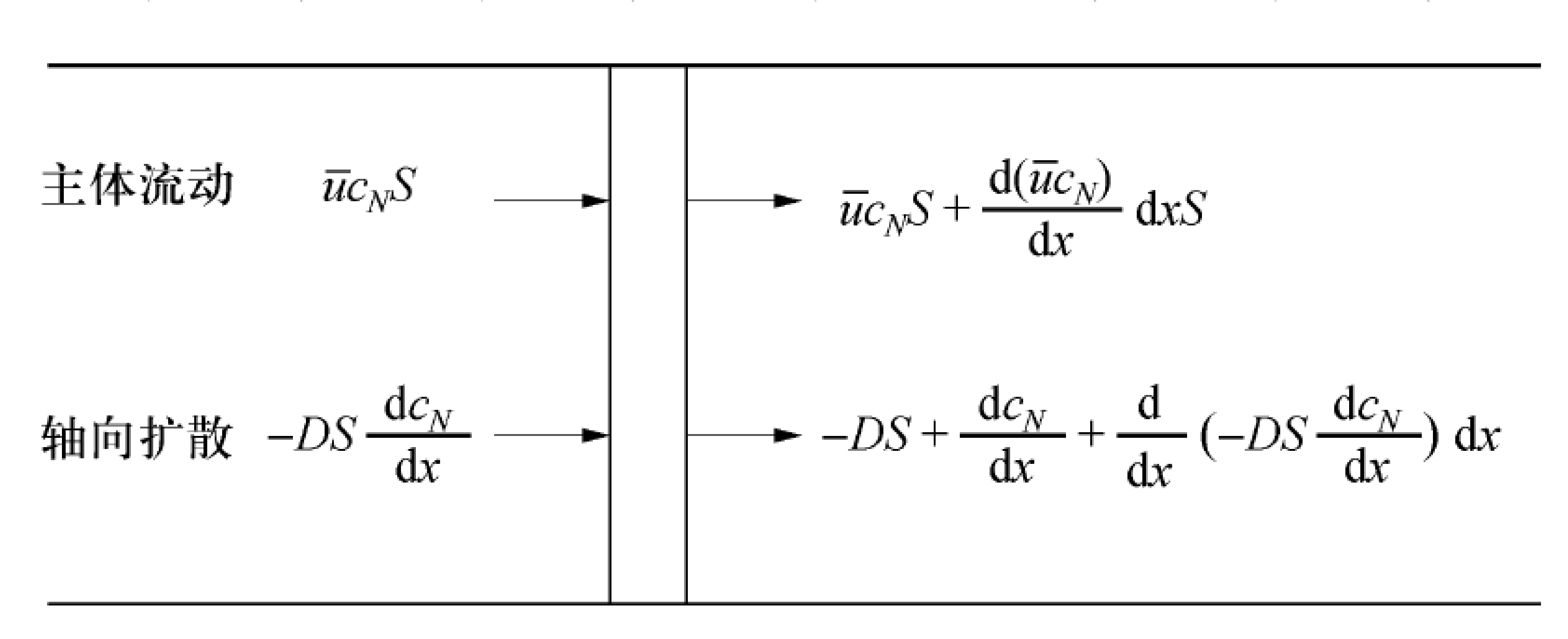


图 5-33　维持管中微元体积内的物料平衡

稳态时，积累项等于零。流入和流出微元体积的微生物既有主体流动的，又有轴向扩散的。

与分子扩散类似，悬浮在培养基中的微生物由于轴向混合在 x 轴方向扩散可以表示为：

$$J_n = -D\frac{dc_N}{dx} \tag{5-160}$$

式中，D 为轴向扩散系数，由液流中返混程度决定。如果 $D=0$，流体接近理想活塞流。另一个极端是 $D=\infty$，管中流体接近全混流。对于湍流，扩散系数准数与雷诺准数（Reynolds number）的关系如图 5-34 所示。

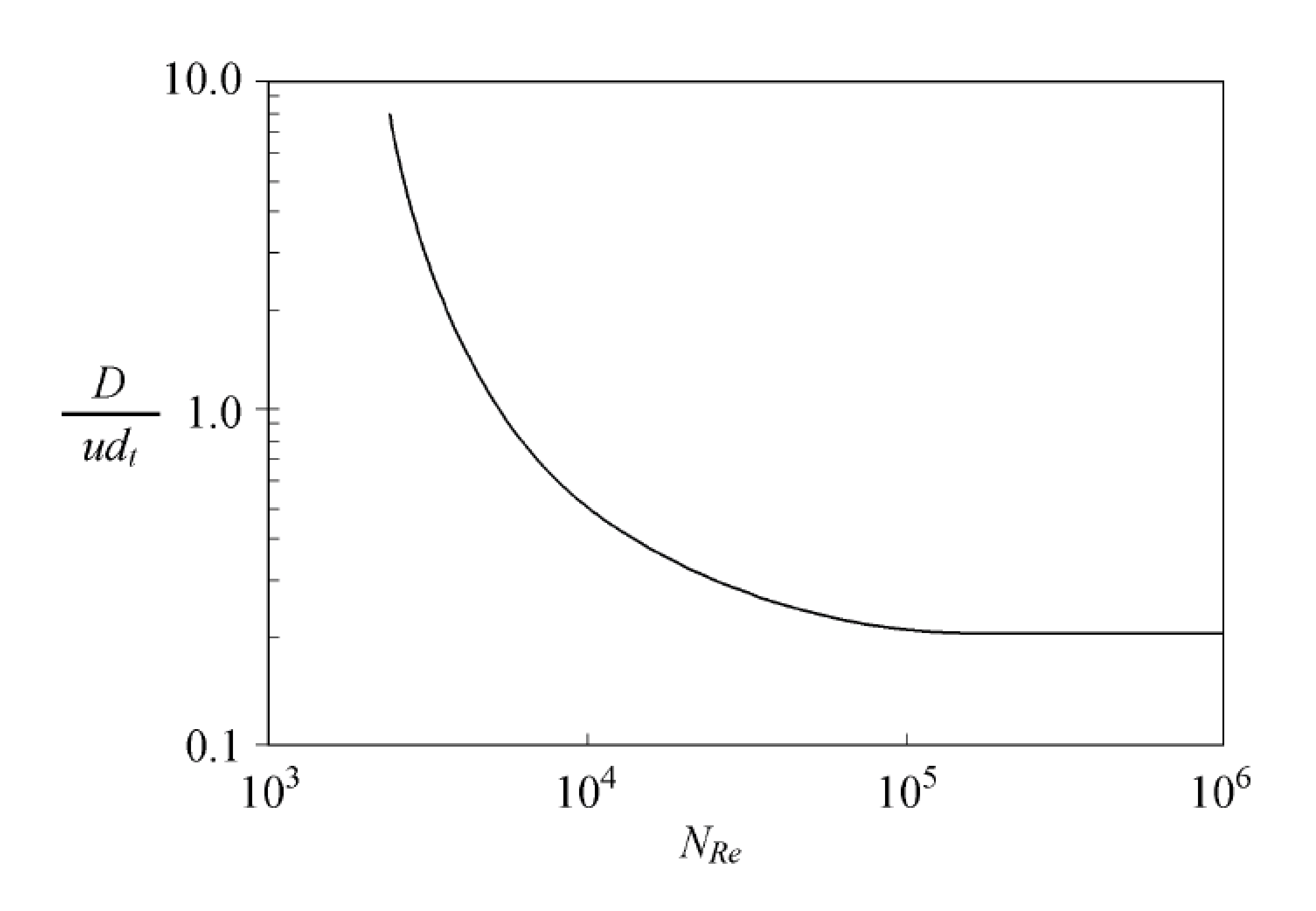


图 5-34　扩散系数准数（D/ud_t）与雷诺准数的关系图

$$N_{Re}=\frac{d_t u\rho}{\mu_L}$$

微元体积内培养基中的菌体死亡总量为

$$\Delta_N = k_D c_n S dx \tag{5-161}$$

对微元体积进行微生物的物料衡算，得到

$$\frac{d}{dx}\left(D\frac{dc_n}{dx}\right)-\frac{d(\bar{u}c_n)}{dx}-k_D c=0 \tag{5-162}$$

对上式进行无因次化，得到

$$\frac{\mathrm{d}^2 c'_n}{\mathrm{d}x'^2} - N_{Pe}\frac{\mathrm{d}c'_n}{\mathrm{d}x'} - N_{Pe}\frac{k_D L}{\overline{u}}c'_n \tag{5-163}$$

其中：
$$c'_n = \frac{c_n}{c_{n0}}, \quad x' = \frac{x}{L}, \quad N_{Pe} = \frac{\overline{u}L}{D}$$

N_{Pe}为 Peclet 准数（Peclet number），当 $N_{Pe}=\infty$，流体为活塞流。上式边界条件为：

当 $x'=0$ 时，
$$\frac{\mathrm{d}c'_n}{\mathrm{d}x'} + N_{Pe}(1-c'_n) = 0$$

当 $x'=1$ 时，
$$\frac{\mathrm{d}c'_n}{\mathrm{d}x'} = 0 \tag{5-164}$$

对方程求解可得：

$$c'_n\big|_{x'=1} = \frac{4\varphi\exp\left(\frac{N_{Pe}}{2}\right)}{(1+\varphi)^2\exp\left(\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right) - (1-\varphi)^2\exp\left(-\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right)} \tag{5-165}$$

其中：
$$\varphi = \sqrt{1 + \frac{4k_D L/\overline{u}}{N_{Pe}}}$$

第三阶段：对于冷却阶段，可以使用合适的冷却剂进行骤冷，或者采用将培养基通入真空室闪蒸冷却。这两种方式用时很少，因此冷却阶段的灭菌常可以忽略。管壳式或板框式热交换器也常用于这个阶段。

可采用等温散热器模型：

$$T_{H_2} = T_C - (T_C - T_{H_1})\exp\left(-\frac{UA\,\overline{\tau}_{cool}}{cW}\right) \tag{5-166}$$

如果采用等流速和热容量冷源逆流冷却方式进行，则：

$$T_{H_2} = T_{H_1} - \frac{\Delta\tau UA\,\overline{\tau}_{cool}}{cW} \tag{5-167}$$

例 5-4　采用蒸汽喷射加热，闪蒸冷却方式对培养基连续灭菌，灭菌流量为 $2\mathrm{m^3/h}$。加热和冷却时间可以忽略。典型的细菌浓度为 $5\times10^{12}\mathrm{m^{-3}}$，灭菌程度达到连续操作 2 个月只允许 1 个细胞存活。培养基中细菌芽孢的热抵抗力可用 Arrhemius 系数（A）$5.7\times10^{39}\mathrm{h^{-1}}$和活化能（$E_d$）$2.834\times10^5\mathrm{kJ\cdot kmol^{-1}}$表示。灭菌器的维持管内径为 0.102m，采用 600kPa（表压）加热灭菌器到操作温度 125℃，该温度下培养基物性参数 $c=4.187\mathrm{kJ\cdot kg^{-1}\cdot K^{-1}}$，$\rho=1000\mathrm{kg\cdot m^{-3}}$，$\mu=4\mathrm{kg\cdot m^{-2}\cdot h}$。问：如果维持管中为活塞流，管道的长度为多少？如果考虑轴向扩散，维持管长度应该是多少？

解

（1）设计准数为

$$\Delta = \ln\frac{N_0}{N} = \ln(5\times10^{12}\times2\times24\times60) = 37.2$$

由于维持管温度恒定，设计准数可简化为

$$\Delta = k_D\tau_{hold}$$

根据已知条件计算 k_D，得

$$k_D = A\exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) = 378.6\ (\mathrm{h^{-1}})$$

因此维持时间为

$$\tau_{hold} = \frac{\Delta}{k_D} = \frac{37.2}{387.6} = 0.0983 \ (h)$$

培养基流速为

$$\bar{u} = \frac{2}{\frac{\pi}{4}0.102^2} = 245 \ (m \cdot h^{-1})$$

维持管长度为

$$L = u\tau_{hold} = 24.1 \ (m)$$

（2）培养基流动时的雷诺准数为

$$N_{Re} = \frac{d\,\bar{u}\rho}{\mu_L} = \frac{0.102 \times 245 \times 1000)}{4} = 6.24 \times 10^3$$

当 $N_{Re} = 6.24 \times 10^3$ 时，$\frac{D}{\bar{u}d_t} \approx 0.8$

因此 $D \approx 0.8\,\bar{u}d_t = 20 \ (m^2 \cdot h^{-1})$

将数据代入公式计算：

$$c'_n\big|_{x'=1} = \frac{4\varphi\exp\left(\frac{N_{Pe}}{2}\right)}{(1+\varphi)^2\exp\left(\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right) - (1-\varphi)^2\exp\left(-\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right)} \quad 和 \quad \varphi = \sqrt{1 + \frac{4k_D L/\bar{u}}{N_{Pe}}}$$

求解上面方程，可得 $L = 26.8$ （m）。

因此，考虑轴向扩散时维持管长度 26.8m，比理想的活塞流流动时要长 2.7m。

5.5.2　过滤除菌动力学

氧气是生物反应工程中微生物所需要的最重要反应底物。通常是以空气的形式提供。由于氧在水中的溶解度比较低，在发酵等过程中需要连续不断地通入无菌空气。无菌空气的制备常用加热、辐射、静电、化学、过滤等方法。

过滤除菌是目前规模化生产、实验室研究中主要的空气除菌方法。所用过滤介质的间隙一般大于细胞颗粒，空气中的微生物菌体依靠气流通过滤层，基于滤层纤维的层层阻碍，迫使空气在流动过程中出现无数次改变气流速度大小和方向的绕行运动，从而导致微生物微粒与滤层纤维间产生撞击、拦截、布朗运动、重力及静电引力等作用，从而把微生物微粒截留、捕集在纤维表面，实现了过滤的目的。填充床过滤器包括：①纤维或颗粒介质填充床过滤器，过滤介质包括棉花、玻璃纤维、腈纶、涤纶、维尼纶或活性炭等；②折叠式硼硅酸超细纤维过滤器，过滤介质有超细玻璃纤维；③烧结金属、陶瓷过滤器；④膜过滤（绝对过滤）器，主要是利用微孔滤膜（microporous membrane）对空气进行过滤，膜上有直径为 0.2～0.45μm 的小孔，大于这一孔径的微生物能绝对截留，膜过滤器的过滤介质有聚四氟乙烯、偏聚二氟乙烯、聚丙烯和纤维素脂膜等。

滤层对空气中颗粒的拦截符合对数穿透定律，可用下式表示：

$$dN/dt = -LN \tag{5-168}$$

$$L = \frac{1}{K}\ln\frac{N_0}{N_S} \tag{5-169}$$

式中：N 为空气中尘埃颗粒数（个/m³）；L 为滤床厚度（cm）；K 常数（cm^{-1}）；N_0、N_S 为过滤器进口和出口空气中尘埃颗粒数（个/m³）。常数 K 值与气流速度、纤维直径、介质填充密度以及空气中颗粒大小有关。

不同介质对颗粒的捕捉能力不一样，表 5-15 列出在一定填充分密度下气体通过介质后的残留颗粒数。介质的过滤效率指过滤层捕集的尘埃颗粒数与原有颗粒数之比，即：

$$\eta = \frac{N_0 - N_S}{N_0} = 1 - P$$

式中：η 为除菌效率（%）；N_0、N_S 为进出口过滤器空气中尘埃颗粒数（个）。

表 5-15　气体通过介质后的残留颗粒数

材　料	流量（$L \cdot min^{-1}$）									
	0.6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
棉花	1.0	0.7	1.9	14.5	29.5	83.4	242.1	268.7	429.7	597
腈纶	4.4	6.2	13.5	21.8	66.6	106.3	202.2	320.4	241.2	372.8
涤纶	5.3	34.6	198.8	874.5	1961.3	2908.7	5738	4063	3510	5757.5
维尼龙	0.5	0.7	0.5	4.6	8.4	18	48	401	1345	15867
丙纶	6.5	10.7	21.7							
玻璃棉	3.2	1.2	3.1	15.8	135	42				
涤－腈无纺布	18.8	91.5	181.2	80.7	147.3	155.5	143	185	119.2	140

直径大于 0.3μm 的颗粒数单位是个/500ml。

工程中常用去除 90% 颗粒数时的效率 η_{90} 对介质进行比较。图 5-35 为空气过滤时空气流速对 K 值和 η_{90} 的影响，可以知道 K、η_{90}、空气线速度有密切的关系。

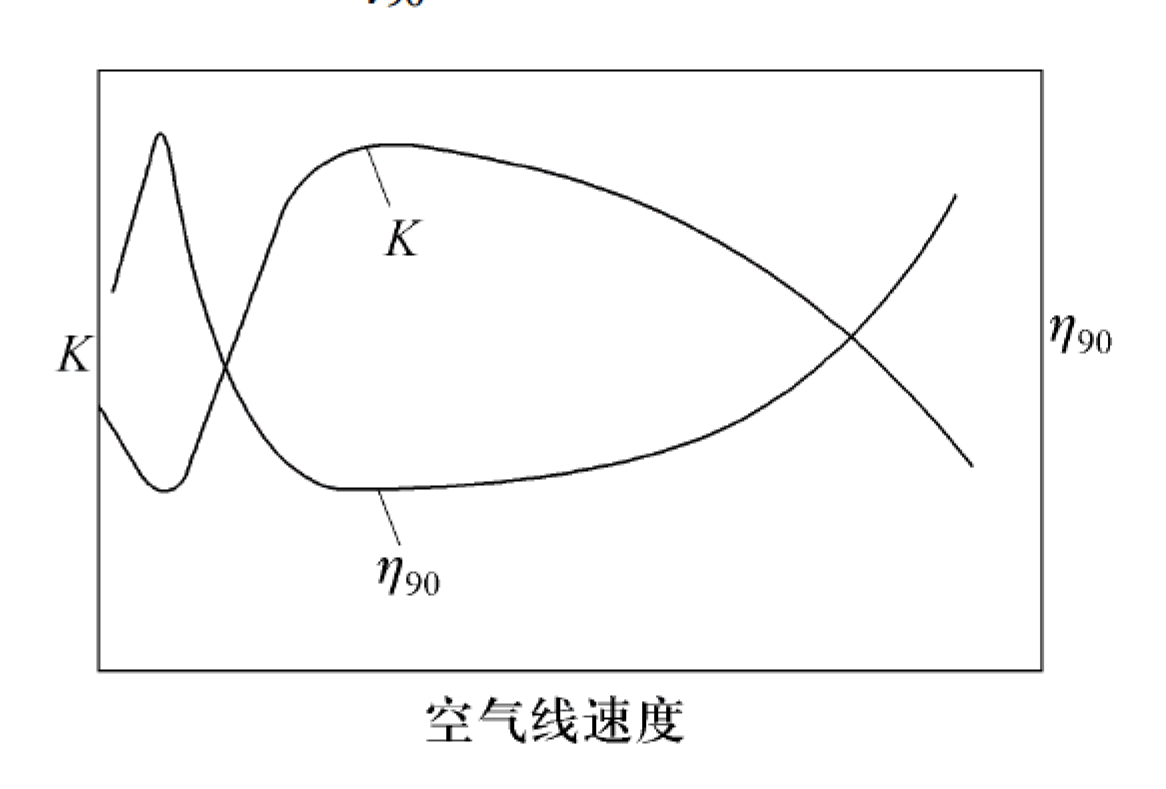


图 5-35　空气线速度与 K、η_{90} 的关系

本章小结

本章分非结构动力学和结构动力学两部分，重点介绍了微生物在液体培养基中的菌体生长、产物合成和底物消耗动力学；与液体培养相对应，本章还就固态发酵的动力学特点进行了阐述；另外，针对培养基和无菌空气制备中的关键目标——微生物的去除，从动力学和工艺设计的角度进行了相关知识的介绍。本章是微生物相关的反应器与反应过程设计与操作的基础。

参考文献

岑沛霖，关怡新，林建平.2005. 生物反应工程. 北京：高等教育出版社

陈坚，李寅.2002. 发酵过程优化原理与实践. 北京：化学工业出版社

藏荣春，夏凤毅.2004. 微生物动力学模型. 北京：化学工业出版社

Cinar A, Parulekar S J, Ündey C, Birol G. 2003. Batch fermentation: Modeling, Monitoring, and Control. New York: Marcel Dekker Inc

Dragana Ajdic. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. PNAS, 99 (22): 14434 ~ 14439

Dutta R. 2008. Fundamentals of Biochemical Engineering. New Delhi: Ane Books India

Harvey W. Blanch, Douglas S. Clark. 1997. Biochemical Engineering. New York: Marcel Dekker Inc

Levenspiel O. 1972. Chemical Reaction Engineering. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons

McNeil B, Harvey L M. 2008. Practical Fermentation Technology. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M. 2006. Solid-state Fermentation Bioreactors. Berling Heidelberg: Springer-verlag

Nielsen J, Krabben P. 1995. Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. Biotechnology and Bioengineer, 46: 588 ~ 598

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G. 2002. Bioreaction Engineering Principles. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/plenum Publisher

Saucedo-Castaneda G, Gutierrez-Rojas M, Bacquet G, et al. 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation, Biotechnology and Bioengineer, 35: 802 ~ 808

习　题

1. 下表中数据是温度对 *Lactobacillus delbruechii* 合成乳酸的影响，该菌株的比生长速率符合 Arrhennius 方程。根据数据计算该过程的活化能。

温度（℃）	40.4	36.8	33.1	30.0	25.1
速率常数（$mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）	0.0140	0.0112	0.0074	0.0051	0.0036

2. 细菌利用甲醇进行好氧分批发酵，其生物量和底物浓度列于下表：

时间（h）	0	2	4	8	10	12	14	16	18
c_X（$g \cdot L^{-1}$）	0.4	0.422	0.61	1.96	3.54	6.4	11.2	12.3	12.4
c_S（$g \cdot L^{-1}$）	18.46	18.42	18.14	16.06	13.6	9.2	1.84	0.154	0

计算：（a）最大生长比速率 μ_{max}；（b）产率系数 $Y_{X/S}$；（c）倍增时间 t_d；（d）饱和常数 K_S；（e）9h 时的生长比速率 μ。

3. 分批培养过程中，微生物以最大生长比速率生长，$\mu_m = 0.425h^{-1}$，同时以一级反应

动力学死亡，$k_d = 0.006\text{h}^{-1}$。接种浓度 $c_{X_0} = 2\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$。活菌体可以合成产物，为半耦联型，其比速率可以用 Luedeking-Piret 方程表示，$\alpha = 0.2\text{kg}$（产物）/kg（生物量）（假设死亡细胞保持完整不自溶）。

（1）如果没有迟滞期，反应进行到 8h 时，活细胞浓度是多少？

（2）如果初始产物浓度为 0，8h 时产物浓度为 $12\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$，Luedeking-Piret 方程中 β 值多大？

（3）初始底物浓度为 $88\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$，如果理论产率系数 $Y'_{X/S} = 0.5\text{kg}$（生物量）/kg（底物），当底物完全消耗时，细胞浓度多大？

（4）倍增时间多长？

4. 如果分批培养过程符合下列条件：生长过程没有迟滞期，无维持能；生长过程中没有细胞死亡；接种细胞 100% 为活细胞；加入固体底物对分批培养体积没有影响；细胞生长以 Monod 方程进行，限制性底物为溶氧；溶氧传输速率等于氧的吸收速率，无积累；氧的消耗只用于生成细胞。在分批培养时合成次级代谢产物，固体营养物质持续供给，细胞以最大生长比速率 μ_{max} 的 10% 生长。同时，为了获得期望的产物，分批培养结束时溶氧饱和度应该不低于 10%。根据下列数据，计算分批反应过程维持的时间和最终的细胞量。

生长过程的部分参数：接种量为 $0.02\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$；最大生长比速率 μ_{max} 为 0.2h^{-1}；培养体系中溶氧饱和时浓度为 $0.007\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$；最大可达到的溶氧体积传质系数为 80h^{-1}；细胞对溶氧的产率系数为 1.5kg（细胞）/kg（氧气）。

传氧速率方程为

$$N_a = k_L a\,(c_g^* - c_0)$$

5. 微生物生长受到 pH 的影响，其动力学方程可以表示如下：

$$\mu_g = \frac{1}{c_X}\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = \frac{\mu_m c_S}{K_S\left(1 + \frac{H^+}{k_1}\right) + c_S}$$

（1）如果给出实验数据（不同时间的 c_X、c_S），如何得到方程的参数 μ_{max}、K_S、K_I？

（2）$1/\mu_{max} - 1/c_S$ 双倒数图如何随着 pH（或 H^+）变化？

6. 推导单细胞生长的模型。细胞利用透（性）酶将底物 S_1 转运进入细胞，透（性）酶受到产物抑制。S_1 转化为前体 P，前体最终转化为细胞的大分子蛋白 M。所有反应的催化剂均为 M。

（1）$S_1^* \xrightarrow[M]{} S_1$（单位表面积）　（式中 S^* = 培养基中 S 的浓度）。

（2）$S_1 \xrightarrow[M]{} P$

（3a）$\left.\begin{array}{l}\text{能量} + P \xrightarrow[M]{} M \\ S_1 \xrightarrow[M]{} \text{能量}\end{array}\right\}$耦联反应

或：

（3b）$S_1 + P \xrightarrow[M]{} M$

细胞干重 T 如下式所示：

（4）$T = S_1 + P + M_1 + \rho V$

（ρ 表示细胞密度，V 表示细胞体积）

推导细胞中 S_1、P、M 和 T 变化的方程，给出各种符合的含义（注：细胞体积是不断变化的）。

7. 实验室研究发现在向反应器中加入与生长速率相同比例的碳源（如糖蜜）时，以维持一定的底物浓度，产物合成效率较高，但是却很难在生产过程中应用，因为没有可靠的方法在生产过程中测定生长速率（r_X）或者细胞浓度（c_X）。生产过程中可以安装溶氧测定仪测定氧气呼吸速率（OUR，$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）。

（1）氧气的消耗可以采用产率系数和维持常数模型描述，写出可以从不同时间的 OUR 估算 c_X 和 r_X 的方程。

（2）根据下表数据计算 $Y_{X/O}$和维持常数。

时间	OUR（$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）	c_X（$g \cdot L^{-1}$）
0	0. 011	0. 60
1	0. 008	0. 63
2	0. 084	0. 63
3	0. 153	0. 76
4	0. 198	1. 06
5	0. 273	1. 56
6	0. 393	2. 23
7	0. 493	2. 85
8	0. 642	4. 15
9	0. 915	5. 37
10	1. 031	7. 59
11	1. 12	9. 40
12	1. 37	11. 40
13	1. 58	12. 22
14	1. 26	13. 00
15	1. 58	13. 37
16	1. 26	14. 47
17	1. 12	15. 37
18	1. 20	16. 12
19	0. 99	16. 18
20	0. 86	16. 67
21	0. 90	17. 01

第 6 章　生物反应过程的传递

【重要概念】

牛顿型与非牛顿型流体、停留时间分布、CPFR、CSTR、轴向扩散模型、槽列模型、调匀度、宏观流体、微观流体、剪切应力、体积溶氧传质系数 k_La

引言

生物反应工程包括原材料的物理和化学处理、培养基的配制和灭菌、各种反应器中生物催化剂的反应过程等，涉及物料混合、输送等多种与动量、热量和质量传递有关的工程问题。可以说，生化过程中的每一个步骤都离不开动量传递、热量传递和质量传递（俗称三传或传递现象）。想要把发酵液从一个容器转移到另一个容器，简单的搅拌混合等，都涉及动量传递，而这不仅涉及动量传递的基本原理，还需要了解生化过程中流体的特殊性；反应器中的生物反应进程，不仅与生物催化剂的性能有关，还与流体在反应器中的流动行为有关，这就需要对生物反应体系中的流体流动进行研究。发酵中通入的氧气是否能有效输送到细胞？这涉及气 – 液间、液体 – 细胞间氧的传质；看似简单的流体加热或培养基灭菌，在实际生产中设计和实施时，需要充分了解整个过程的热量传递。无论是新产品、新工艺的研究，还是进行过程设计、反应器设计和制造、自动控制，都需要应用动量、热量和质量传递的知识。传递过程的理论对过程开发、过程设计、生产操作、优化控制及过程机制研究都有重要的实用意义。

本章介绍生物反应体系的流变特性、生物反应体系中的流体流动模型、生物反应器中的搅拌与混合、气 – 液传质动力学与体积传质系数的测定、热量传递等内容。通过本章内容的学习，可帮助读者更深入了解生化过程中各传递过程的机制，学习对所研究的问题建立数学模型的方法，为利用现代计算方法和成熟计算机软件包进行传递过程的数值模拟打下必要的理论基础。

6.1　生物反应体系的流变学

生物反应体系的流变学性质是指流体的流动特性，它直接影响生物过程的混合行为、各种传质过程和热传递，进而影响生物反应的周期和产出、传感器的响应和可靠性，对产品分离纯化也起着很大作用。

生物反应所处理的物系组成十分复杂。以发酵液为例，接种前的培养基通常为牛顿型流体；但随着发酵的进行，流变性逐渐变得复杂：有溶解于水中的营养物质、代谢产物，还可

能有细胞及大分子、形态多样的固体物质等，这种物系通常为非牛顿型的流变学上的复杂物系。其异常的流变特性主要表现为剪切黏度依赖性和一定的黏弹性行为。

一些稀薄的细菌发酵液、以水解糖或糖蜜为原料培养酵母的料液、被噬菌体侵害的发酵液等均为牛顿型流体。微生物以菌丝形式生长比以菌球形式生长对流变学性质的影响更大，在丝状菌发酵中，生物量的影响作用显著。丝状菌悬浮液中菌呈丝状或团状，菌丝一般有一个以上的分支，这些菌丝长 50～500μm，直径为 9～10μm。反应器中，菌丝体纠缠在一起，使悬浮液黏度达 Pa·s 水平。团状菌丝体是以稳定的球状积聚在一起而生长，其直径可达几毫米。无论是丝状或团状，其流变学特性都是非牛顿型流体（表 6-1）。

表 6-1　几种抗生素发酵液的流变特性

产　　物	微　生　物	流 变 特 性
制霉菌素	诺尔斯链霉菌	牛顿型流体
青霉素	产黄青霉菌	假塑性流体
青霉素	产黄青霉菌	塑性流体
青霉素	产黄青霉菌	胀塑性流体
链霉素	灰色链霉菌	塑性流体
新生霉素	雪白链霉菌	塑性流体
卡那霉素	卡那霉素菌	假塑性流体
曲古霉素	卡那霉素链霉菌	塑性流体
曲古霉素	卡那霉素链霉菌	假塑性流体
非洛霉素	卡那霉素链霉菌	假塑性流体

丝状菌发酵中，高黏度发酵液的表观黏度明显随剪切速率的不同而变化。同一反应器中，发酵液离搅拌器远近位置的不同，流动特性会明显不同。

微小颗粒悬浮液的黏度是多种因素的函数，除依赖菌体颗粒的浓度外，还受颗粒的形状、大小、变形度、表面特性等因素影响。霉菌或放线菌等的发酵过程中，发酵液的流动特性常出现大幅度变化。

丝状菌发酵中，菌体相互间易形成网状结构，在一定的剪切速率下，团状结构的菌团可被打碎成小片，虽然这些小碎片可再聚集起来，但在高剪切速率下，絮集起来的菌团又将被打碎，使发酵液呈牛顿型流体特性。

迄今所研究的胞外产物中，只有多糖对介质的流变学性质的影响较大。其他大分子（如蛋白质）也会影响介质的流变学性质，特别是存在分散得很小的气泡时。

生物反应体系的流变学性质通过影响流体的流动特性而影响传质与传热，进而影响生物反应速率和细胞的新陈代谢。

6.1.1　生物反应体系的流变学性质

流变学通常用黏度、流动行为和屈服应力来对流体进行描述。流体流动时，相邻具有不同速度的流体单元相互施加剪切应力，流体的流变学性质用剪切应力 τ 与剪切率（剪切率）γ 的关联式来描述：

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n \tag{6-1}$$

式中：K 为黏度系数；τ_0 为屈服应力；n 为幂定律指数或流动特性指数。式（6-1）称为幂

定律方程，根据此方程，流体分为以下几类。

1. 牛顿型流体　当 $n=1$，$\tau_0=0$ 时，式（6-1）变为

$$\tau = \mu\gamma \tag{6-2}$$

式中：τ 为流体剪切应力（Pa）；μ 为流体的动力学黏度（Pa·s）；γ 为剪切率（s^{-1}）。此方程称为牛顿黏性定律，流动特性服从牛顿黏性定律的流体（如气体、低分子液体）称为牛顿型流体（图 6-1 中曲线 1），牛顿型流体的黏度在温度恒定时保持不变。不服从牛顿黏性定律的流体为非牛顿型流体，其剪切应力与剪切率之比不是常数，而是随着剪切率变化，因而没有确定的黏度值。以下几种为常见的非牛顿型流体。

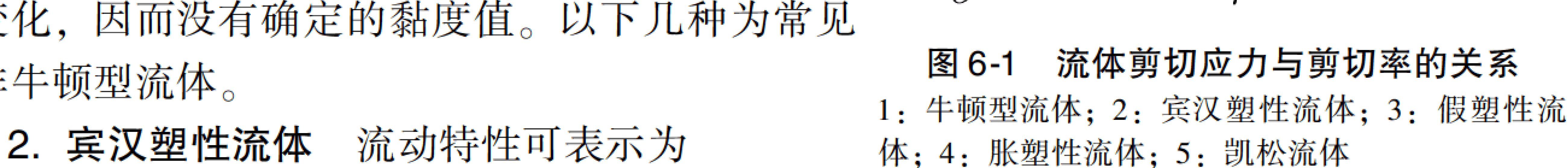


图 6-1　流体剪切应力与剪切率的关系

1：牛顿型流体；2：宾汉塑性流体；3：假塑性流体；4：胀塑性流体；5：凯松流体

2. 宾汉塑性流体　流动特性可表示为

$$\tau = \tau_0 + \eta\gamma \tag{6-3}$$

式中：τ_0 为屈服应力（Pa）；η 为刚度系数（Pa·s）。

宾汉塑性流体的特点是当剪切应力小于屈服应力 τ_0 时，流体不发生流动，只有当剪切应力大于屈服应力时，流体才发生流动，其流动曲线为不通过原点的直线（图 6-1 中曲线 2），曲线的纵轴截距为屈服应力 τ_0。

3. 假塑性流体　流动特性为

$$\tau = K\gamma^n, \quad 0 < n < 1 \tag{6-4}$$

式中：K 为黏度系数（$Pa \cdot s^n$）；n 为流动特性指数。

流体的黏度系数 K 越大，流体就越稠厚。流动特性指数 n 越小，流体的非牛顿型特点越明显。

4. 胀塑性流体　其流动特性也具有指数规律，但其流动特性指数 $n>1$，n 越大，流体的非牛顿型特性就越显著。

$$\tau = K\gamma^n, \quad n > 1 \tag{6-5}$$

5. 凯松流体　其流动特性方程为

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + K_c\gamma^{1/2} \tag{6-6}$$

式中：τ_0 为屈服应力（Pa）；K_c 为凯松黏度（$Pa^{1/2} \cdot s^{1/2}$）。

非牛顿型流体没有确定的黏度值，通常把一定切变速率下剪切应力与此剪切率之比称为表观黏度，即：

$$\mu_a = \tau/\gamma \tag{6-7}$$

式中，μ_a 为表观黏度（Pa·s）。从图 6-1 可以看到，胀塑性流体的表观黏度随剪切率的增大而增大，而其他 3 种非牛顿型流体则相反。

在生化过程中，不同发酵液，甚至不同的发酵时期的流体可能具有不同的流变特性，常用的发酵液流变方程列于表 6-2。而植物细胞培养液的黏度多具有假塑性，部分体系的流变特征见表 6-3。

表 6-2　常用发酵液的流变方程

类型	流变方程	表观黏度	举　例
牛顿型流体	$\tau=\mu\gamma$	恒定不变	谷氨酸发酵液，大多数的细菌、酵母菌发酵液
宾汉塑性流体	$\tau=\tau_0+\eta\gamma$	随剪切率的增大而减少	黑曲霉、链霉素等发酵液
假塑性流体	$\tau=K\gamma^n$，$0<n<1$	随剪切率的增大而减少	大多数发酵液，赤霉素、红霉素发酵液
胀塑性流体	$\tau=K\gamma^n$，$n>1$	随剪切率的增大而增大	链霉素、四环素、卡那霉素发酵前期发酵液
凯松流体	$\tau^{1/2}=\tau_0{}^{1/2}+K_c\gamma^{1/2}$	随剪切率的增大而减少	透明质酸溶液、青霉素等发酵液

表 6-3　植物细胞培养液流变特征

细胞体系	生物量浓度（$g\cdot L^{-1}$）	流变特性	细胞体系	生物量浓度（$g\cdot L^{-1}$）	流变特性
烟草 紫苏 长春花	≤13 <20 ≤15	假塑性 $n=0.7$ 宾汉塑性 假塑性 $n=0.53$	曼陀罗 柘树	≤450（鲜重）	凯松塑性流体 假塑性流体 $n=0.53$

人们熟悉的一些流体情况如下所述：①牛顿型流体。气体、水、低分子质量液体、低分子化合物的水溶液。②宾汉塑性流体。纸浆、牙膏、油、巧克力。③假塑性流体。淀粉悬浮、纸浆、油漆。④胀塑性流体。玉米粉和糖溶液、淀粉、流沙。⑤凯松流体。血、番茄酱、橘子汁。

6.1.2　影响流变性质的因素

在生化反应过程中，随着体系中细胞浓度和形态的变化，以及底物的消耗和代谢产物的积累，体系介质的流变性质和类型会发生明显变化，表现出时变性。图 6-2 为真菌 *Aspergillus awamori* 培养液的黏度系数 K 和流动特性指数 n 随发酵时间的变化情况。

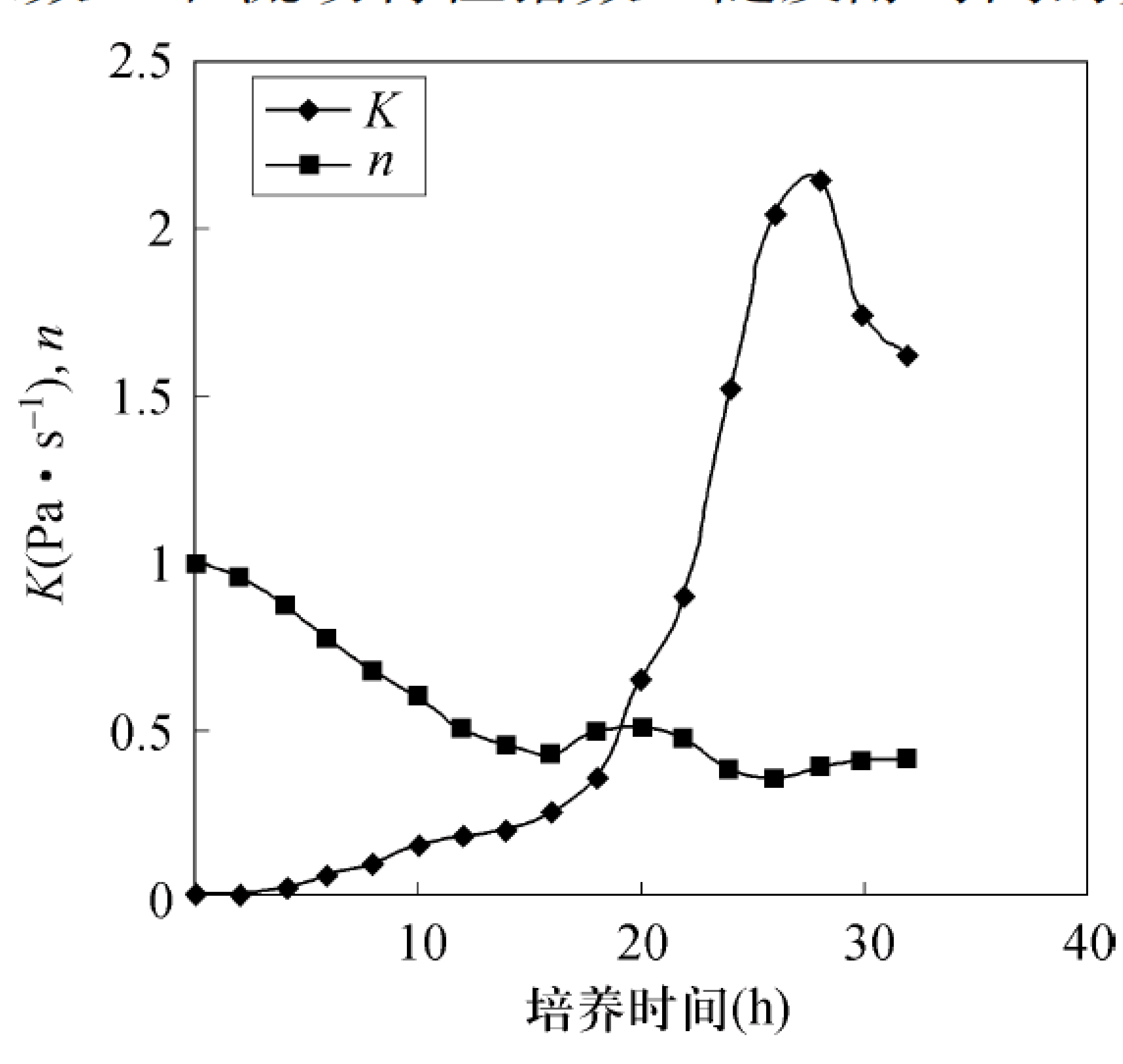


图 6-2　*Aspergillus awamori* 培养液的黏度系数 K 和流动特性指数 n 随发酵时间的变化

生物反应体系十分复杂，其中水所占的比例最大。除溶解于水的各种营养成分及细胞的代谢产物外，还有大量的细胞、构成培养基的不溶性物质等固相物。一般在体系中的液相部分黏度很低，随着其中细胞浓度的增加，体系黏度也相应增大（图 6-3）。此外，细胞的形态、多糖和胞外蛋白质及其他代谢产物等都会导致介质流变性质的改变。

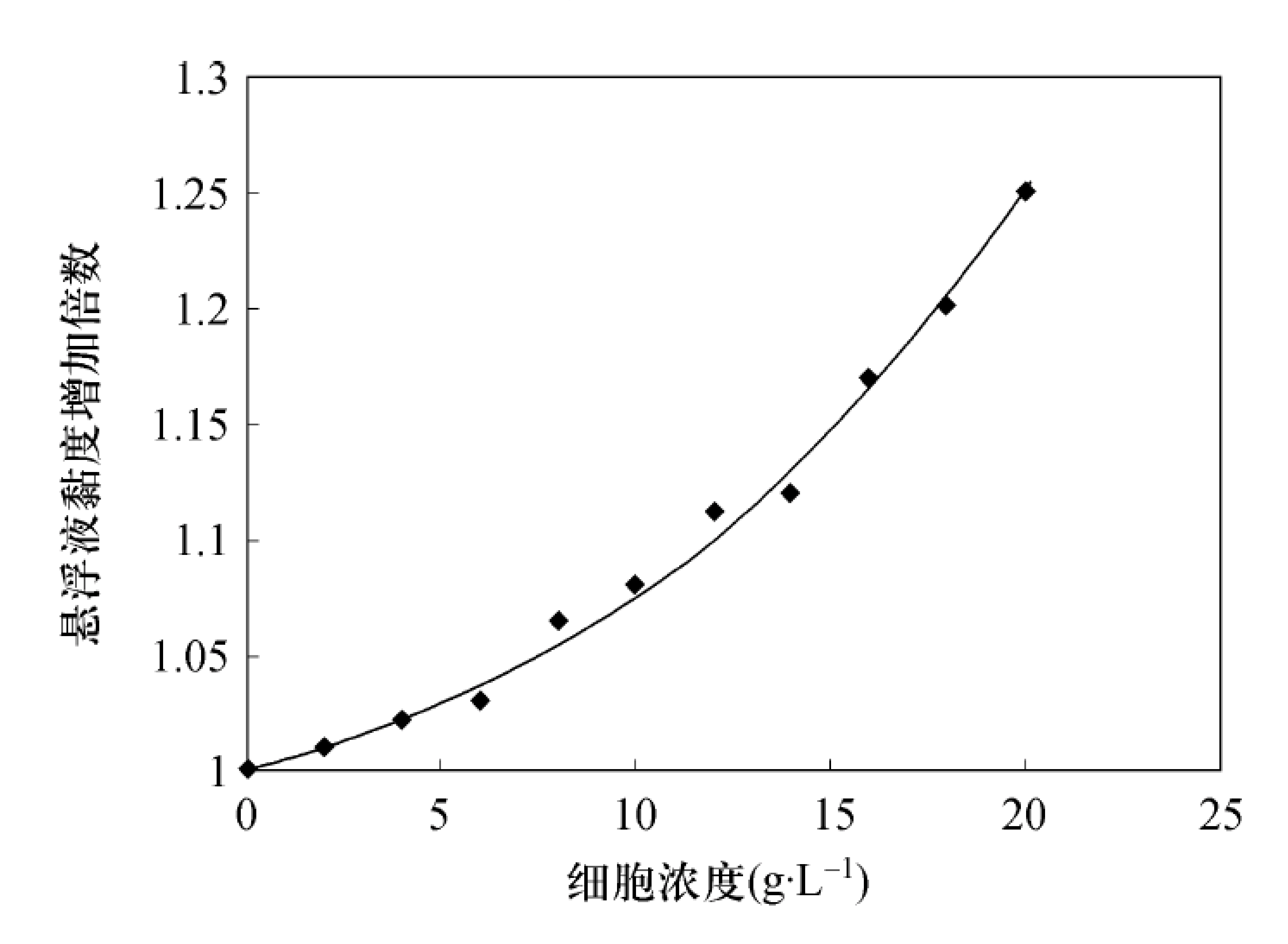


图 6-3　多形汉逊酵母培养液的黏度与细胞浓度的关系

当体系介质中的颗粒（含细胞）呈球状或接近球形，且浓度较低时，悬浮液为牛顿型流体，其黏度可据 Einstein 公式计算：

$$\mu_S = \mu_L(1 + 2.5\Phi) \tag{6-8}$$

式中：μ_S 为悬浮液表观黏度（Pa · s）；μ_L 为悬浮液中纯液相黏度（Pa · s）；Φ 为颗粒的体积分数。

当细胞浓度很高（$\Phi > 40\%$）时，上述线性关系不再成立，Vand 提出以下关系式：

$$\mu_S = \mu_L(1 + 2.5\Phi + 7.25\Phi^2) \tag{6-9}$$

此外还有不少其他经验关联式，在此不再赘述。高浓度的细胞悬浮液可成为非牛顿型流体，其表观黏度与细胞浓度 c_X 有关：

$$\mu_a \propto c_X \tag{6-10}$$

图 6-4 为不同形态、不同培养时间的黑曲霉培养液的表观黏度与菌体浓度的关系，可见

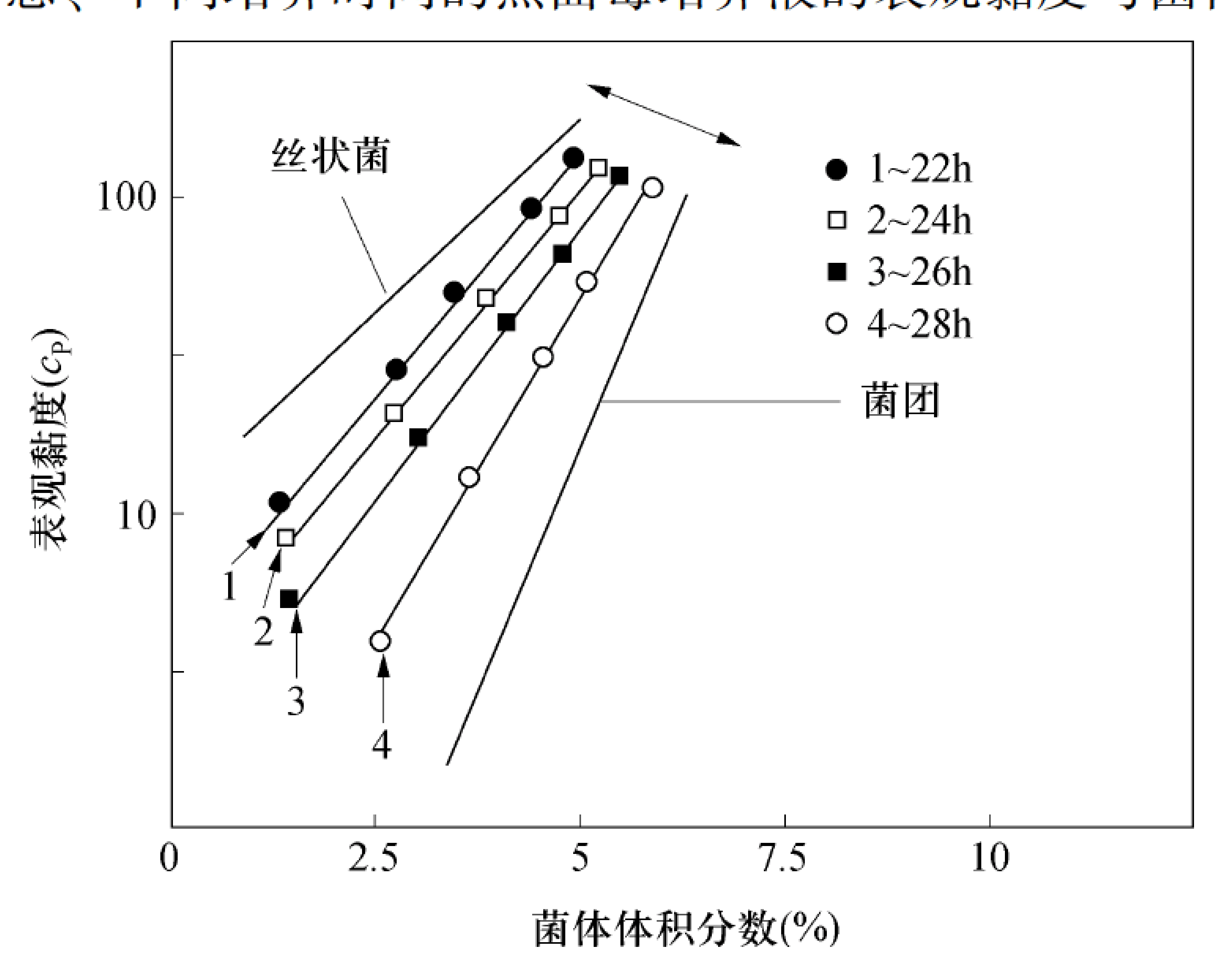


图 6-4　不同形态和菌龄的黑曲霉培养液的表观黏度与菌体浓度的关系

细胞形态的变化对培养液的流动特性有很大影响。对于具有假塑性的丝状真菌悬浮液，当剪切率较低时，由于菌丝体的相互牵制，表观黏度较高；随着剪切率的增大，菌丝被拉伸甚至撕断，导致表观黏度下降。

发酵培养液中的胞外产物是影响其流变特性的另一重要因素，特别是在多糖物质存在时，会导致其表现非常明显的非牛顿型流动特征。例如，野油菜黄单孢菌培养液和滤液均呈假塑性，二者的流动曲线十分接近，表明该体系的假塑性是由黄单孢菌分泌的胞外多糖黄原胶引起，细胞的存在对体系的流动特性影响很小。此时，影响体系黏度的主要因素是多糖的浓度，随着多糖浓度的增大，培养液的黏度系数大大增加，表观黏度迅速增加。

6.1.3　流体性质对生化过程的影响

流体性质特别是黏度对整个发酵过程有着多方面的影响（图 6-5），本节从溶氧和搅拌两方面进行讨论。

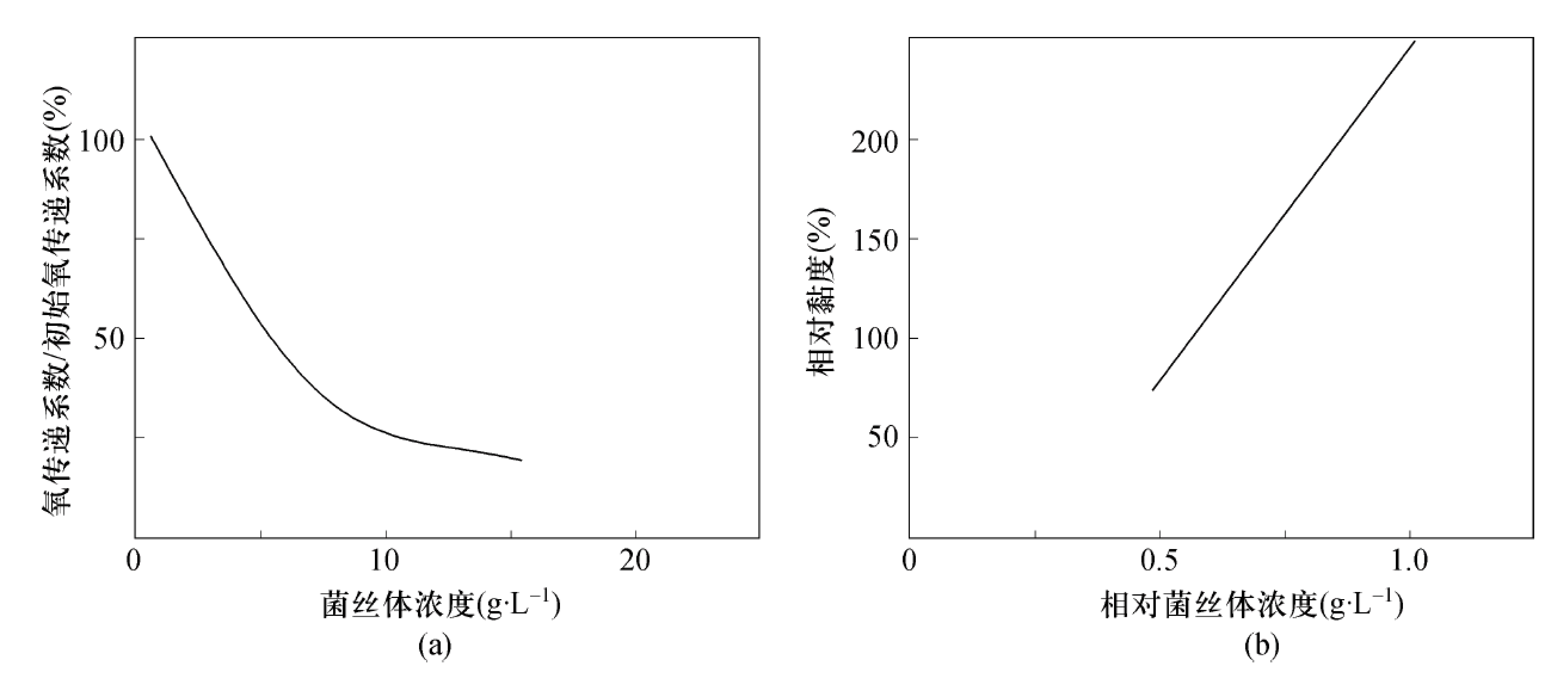


图 6-5　青霉培养物中菌丝浓度对氧传递系数和表观黏度的影响

1. 流体性质对氧传递的影响　在培养液中，氧的传递受到培养液流变学的影响，氧传递系数随黏度的增加而下降（图 6-5），丝状菌的生长会迅速受到氧限制。造成氧传递速率低的原因可能是形成气泡的速率低、气泡合并速度增加或培养液在发酵罐中流动速度降低。如果培养物受氧限制，生长量就与氧传递量相关。在分批培养中，菌丝体浓度增加，氧传递速率迅速降低，生长速率很快减慢到零。在受氧限制的连续培养中，由于单位培养基中氧传递的总量随滞留时间的降低而降低，在高的稀释率下，菌丝浓度将下降。为了克服氧限制在工业发酵中的影响，可加水稀释发酵液，从而降低黏度，增加氧传递速度。

体积传质系数 k_La 除了受搅拌功率、通气速率等操作条件的影响外，还受到液体的物理性质的影响。在同样的操作状态下，液体的黏度越大，体积传质系数 k_La 就越小。为了克服菌丝体丝状生长给培养造成的上述不利影响，有人开发了限制菌丝体在塑料多孔小颗粒上生长的技术，使产黄青霉的菌丝生长成球形颗粒，培养液黏度降低，气－液质量传递系数 k_La 比游离细胞培养高 2～3 倍，最终细胞密度和青霉素效价都明显提高。结合使用鼓泡塔型反应器，使通气所需的能量减少 50%。

2. 在非牛顿型流体中的搅拌功率　除了氧传递速率低外，拟塑性流动特性和屈服应力能影响发酵罐中的混合条件，造成不均一性。在靠近搅拌桨的高剪切区，发酵液黏度较低，

处湍流状态；离开高剪切区，黏度增加，处于层流状态；在靠近挡板和罐壁等表面的地方出现静止区。菌丝体处于充分通气的区域和相对静止而缺氧的区域间的变化周期中。在换热器周围的滞留层还妨碍热的排除。在连续培养中，处于混合差的区域里的菌丝体不易被冲出，因而可观察到异常的动力学现象（图 6-6）。为了克服这些混合问题，要提高动力输入，设计高泵送率的搅拌器。

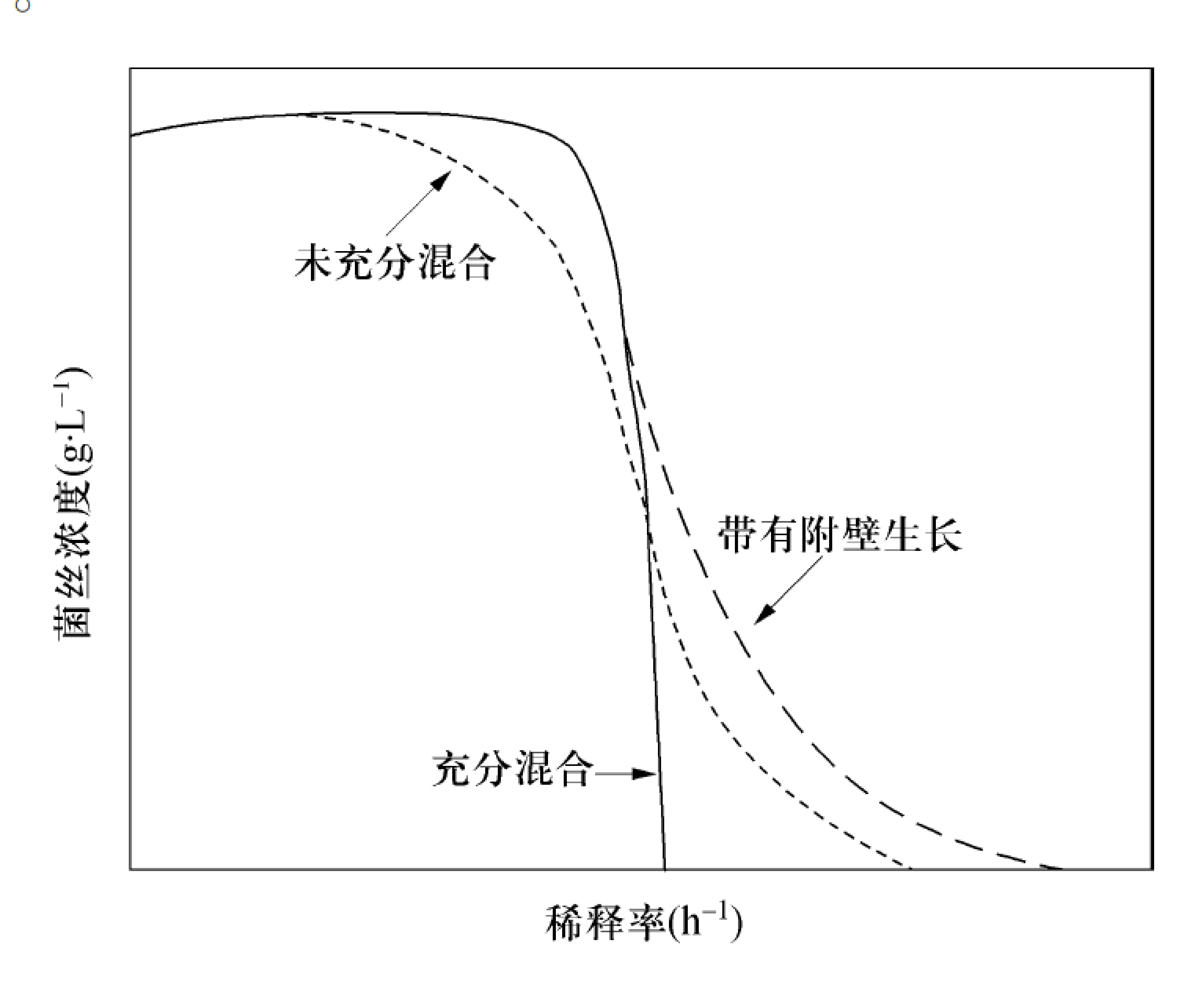


图 6-6　细胞浓度与稀释率的关系

由于非牛顿型流体的表观黏度随剪切率变化，没有确定的黏度值，也就不能确定搅拌的雷诺准数，所以不能像牛顿型流体那样作出功率准数 N_P 与 Re 的关系图。在搅拌条件下，非牛顿型流体的平均剪切率与搅拌转速成正比：

$$\gamma = KN \tag{6-11}$$

式中：γ 为平均剪切率（s^{-1}）；K 为常数。

按照非牛顿型流体的平均剪切率求出其表观黏度，从而求出 Re。研究人员在多种拟塑性、胀塑性和宾汉性流体中对不同搅拌器进行试验，得出上式中常数 K 的范围为 10 ~ 13。在拟塑性非牛顿型流体中，K 值一般取 11.5，不会引起很大误差。

将在非牛顿型流体中的搅拌功率准数与 Re 在对数坐标上标绘，得到的曲线与牛顿型流体相似（图 6-7）。当 $Re < 10$ 时，液体处于层流状态，N_P 与 Re 成为斜率为 -1 的直线，当 $Re > 500$ 时，液体处于湍流状态，N_P 保持恒定，而 $10 < Re < 500$ 时，液体为过渡流状态时，N_P 与 Re 之间的关系比较复杂。

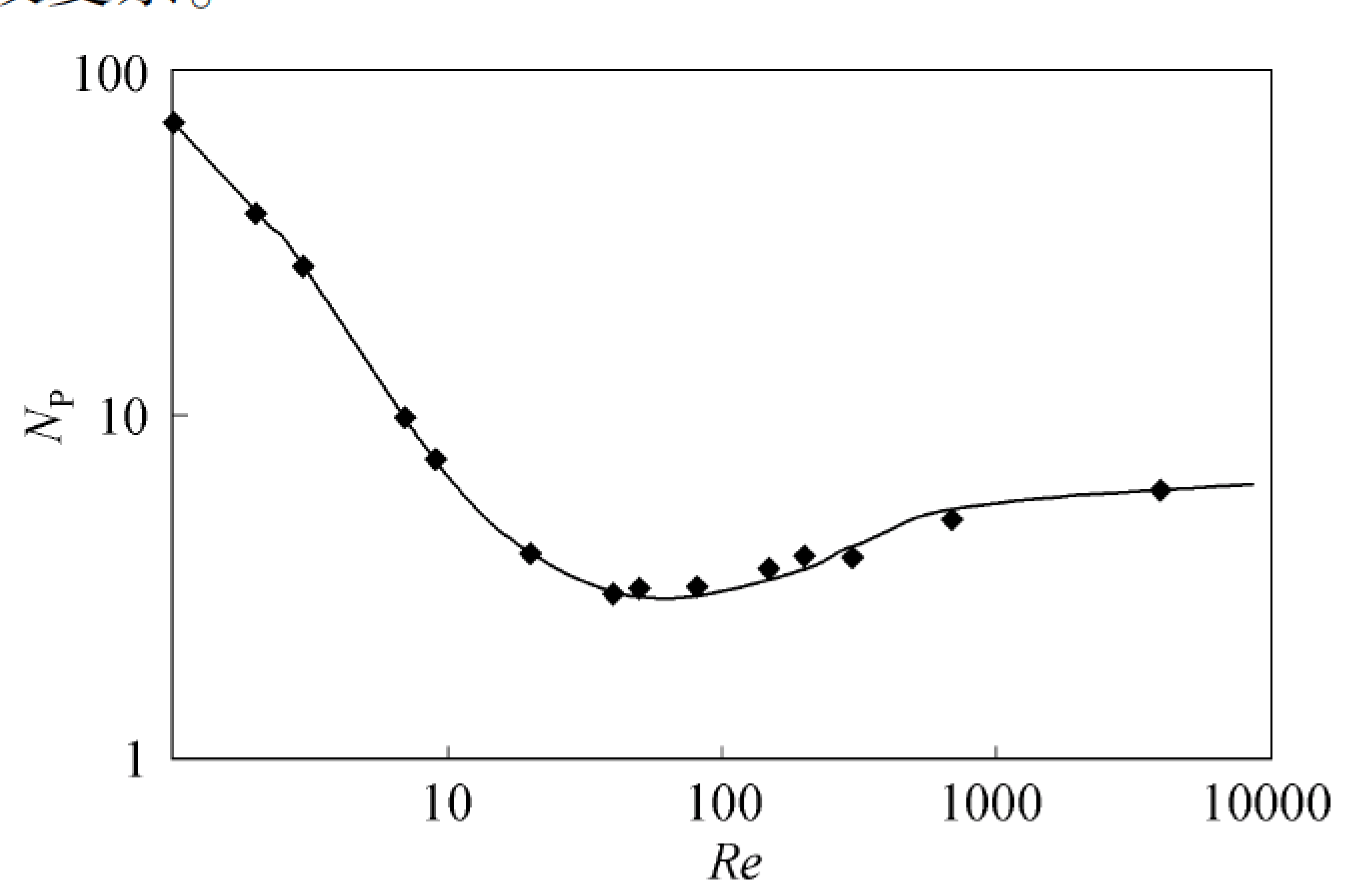


图 6-7　非牛顿型流体中功率准数与 Re 的关系

总之，流体特性因素会对生物反应器内的质量与热量的传递、混合特性及菌体生长等产生影响。

黏度对发酵过程的影响远不止以上两点，图 6-8 可以帮助你考虑黏度的多方面影响。

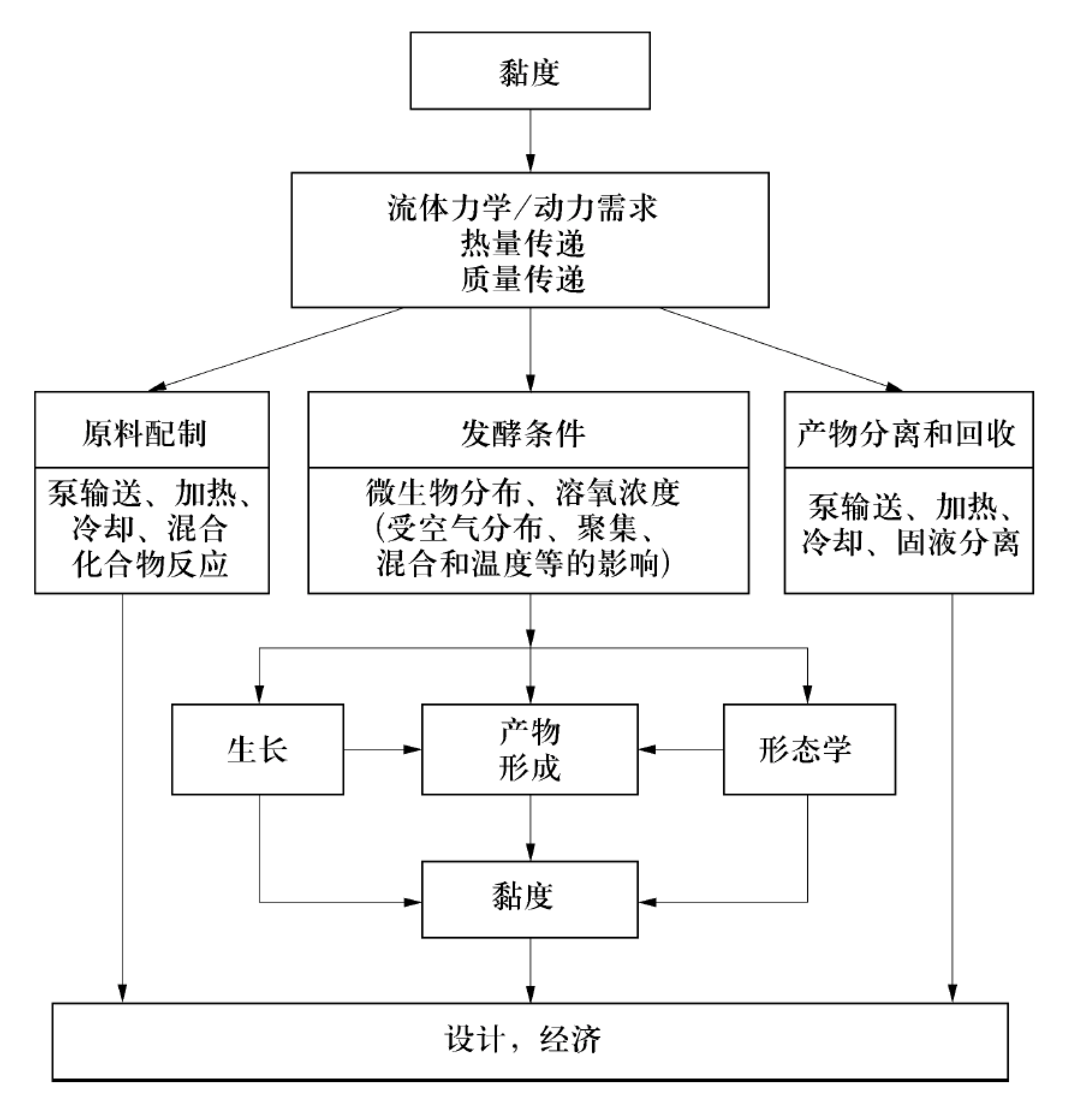


图 6-8　黏度对发酵过程的影响

6.2　生物反应体系中的流体流动模型

生物反应体系的流体流动模型是对流体流经反应器时流动和返混状况的描述。反应器的操作分为连续和间歇操作。在间歇操作的反应过程中，反应器内的物料间歇地加入和取出，反应物料的各种参数（如浓度和温度等）随时间变化，但不随反应器内的位置变化，物料中所有的粒子在反应器内的停留时间是相同的。而在连续操作中，同时进入反应器的各流体粒子在反应器内的停留时间却不一定相同。造成这种停留时间不同的原因包括摩擦造成的流速分布不匀、分子扩散、涡流扩散、搅拌引起的强制对流、沟流及死区等。

流体的不同流动状况使反应物料在反应器内停留时间不同、混合状况不同，导致反应的局部环境不同，进而影响反应速率、反应选择性和达到给定转化率所需要反应器体积，因此流体流动模型是反应器研究的重要内容。

实际反应器的复杂流动状况可以在数学表达简单、意义明确，且能反映流动过程主要特征的理想反应器模型的基础上，进行修正和组合，从而得到符合实际的非理想流动模型。

6.2.1　理想反应器的流动模型

平推流与全混流是两种极端的理想流型，具有这两种流型的反应器称为理想反应器：平

推流反应器（continous plug flow reactor，CPFR）、理想间歇反应器和全混流反应器（continous stirred-tank reactor，CSTR）。

1. CPFR　平推流反应器模型中，物料以稳定的流量由反应器的一端流入反应器后，各物料微元沿流动方向以相同的速度向前移动，完全没有轴向混合与扩散，就好像活塞在气缸里向前平推一样。所以又称为“活塞流”，如图 6-9 所示。

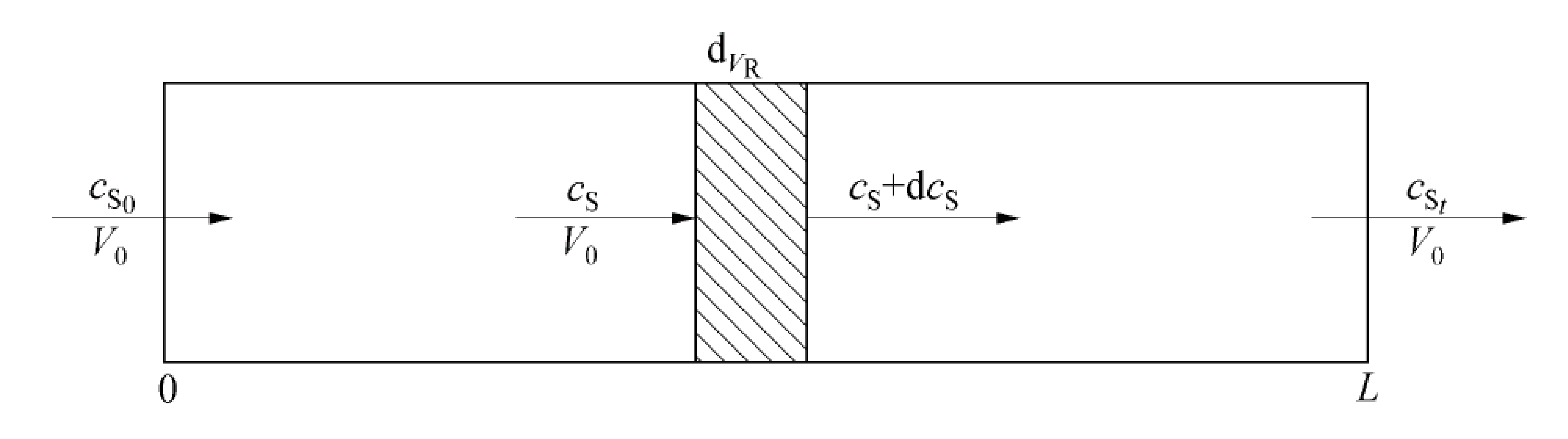


图 6-9　CPFR 模型

1）CPFR 基本特征：活塞流模型的混合情况是没有轴向空间混合，也没有返混。活塞流模型的特点是：在与流动方向垂直的任意截面上各点，物料的流速、浓度、温度及停留时间等完全相同；物料的浓度、温度等各参数沿流动方向递变；在每一截面上物料各参数都不随时间而变化。

对 CPFR 的物料衡算需考虑反应器中组分浓度在流动方向上的变化。若在流动方向上取长度为 $\mathrm{d}l$、体积为 $\mathrm{d}V_R$ 的微元体对底物做物料衡算，则有

$$v_0 c_S = v_0(c_S + \mathrm{d}c_S) + r_S \mathrm{d}V_R + \frac{\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t}\mathrm{d}V_R \tag{6-12}$$

连续定态操作时，$\frac{\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t}=0$，于是：

$$-v_0 \mathrm{d}c_S = r_S \mathrm{d}V_R \tag{6-13}$$

对整个反应器有

$$-\int_{c_{S0}}^{c_{Sf}} \frac{\mathrm{d}c_S}{r_S} = \int_0^{V_R} \frac{1}{v_0}\mathrm{d}V_R \tag{6-14}$$

$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = \int_{c_{Sf}}^{c_{S0}} \frac{\mathrm{d}c_S}{r_S} \tag{6-15}$$

式中，τ_P 为 CPFR 的空时，其值等于物料在 CPFR 中的停留时间。

2）CPFR 的停留时间分布

图 6-10 的实线为阶跃输入法向 CPFR 中输入示踪剂及其应答。显然停留时间分布函数有如下规律。

$$F(\theta)=0,\ \theta<1;\ F(\theta)=1,\ \theta\geqslant 1 \tag{6-16}$$

$$E(\theta)=0,\ \theta\neq 1;\ E(\theta)\to\infty,\ \theta=1 \tag{6-17}$$

$$\bar{\theta}=1,\ \sigma_\theta^2=0 \tag{6-18}$$

即，当 $\theta<1$（$t<\bar{t}$）时，平推流的物料中不含示踪物，即 $F(\theta)=0$；当 $\theta\geqslant 1$（$t\geqslant\bar{t}$）时，$F(\theta)=1$，由 0 突变为 1，而且持续此值。从两种示踪剂输入的应答结果可以看出，输入为何函数，输出也为何函数，这是平推流反应器停留时间分布的重要特点。

2. 间歇完全混合流动模型、理想间歇反应器　这种模型又称为间歇全混式流动模型。其混合情况为：空混 = ∞，返混 = 0。因而这种模型的特点是：由于空混 = ∞，反应器内各

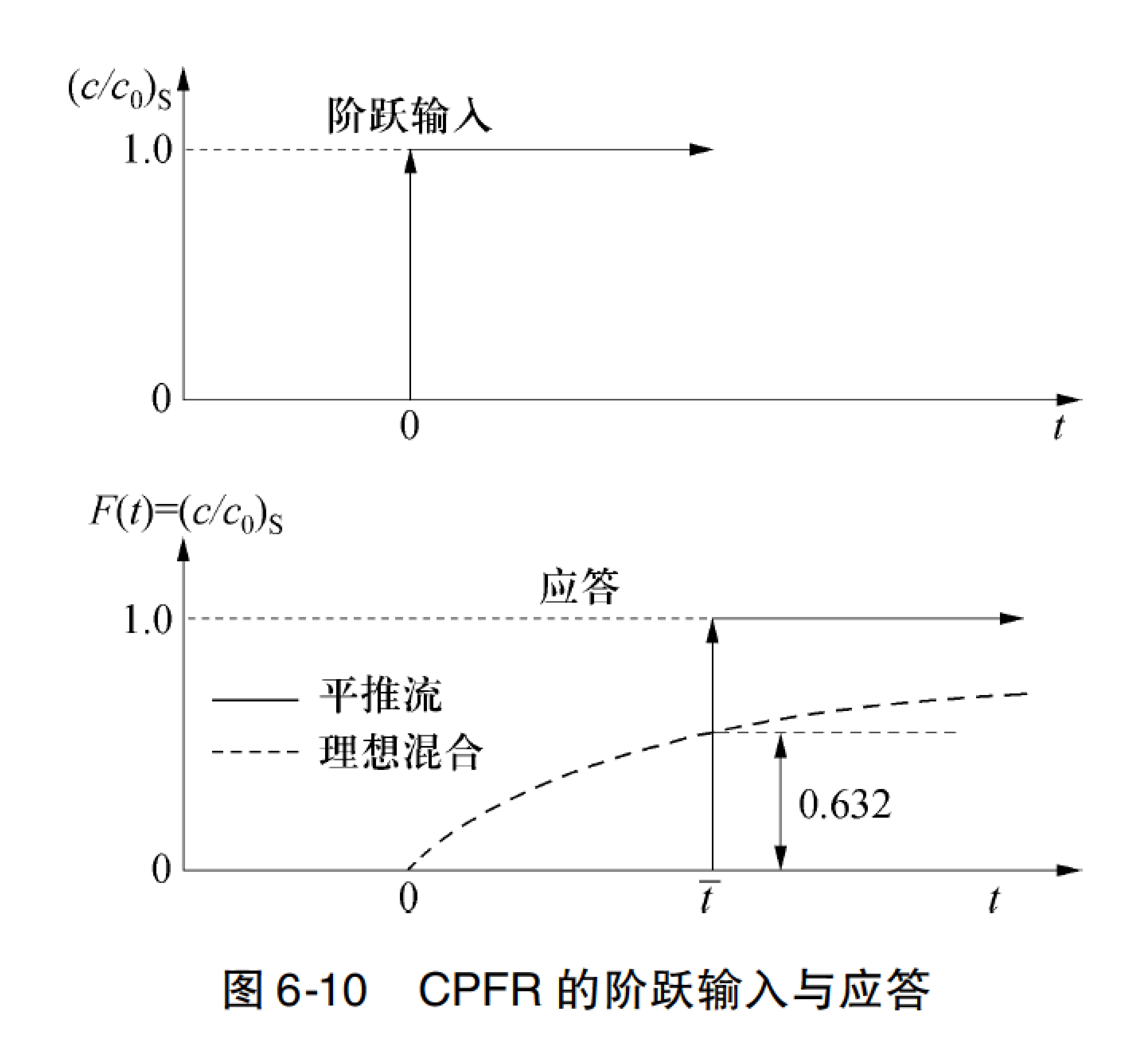


图 6-10　CPFR 的阶跃输入与应答

点的浓度是均匀的，温度也是相等的，其他参数也是一致的，只随时间而变化，因而是不稳定过程；由于返混 =0，故所有物料在反应器内的停留时间相同，不存在停留时间分布。凡是符合上述特点的反应器称为理想间歇反应器。

在实际的生化生产中，完全符合上述特点的反应器是不存在的。但有些情况下的反应器与上述特点比较接近。例如，在釜式反应器中进行液相反应，如图 6-11 所示，反应物料一次性加入，在强烈搅拌下进行反应，反应物结束后物料一次性放出。这种间歇搅拌釜可作为理想间歇反应器处理。

3. CSTR　在全混流反应器模型中，在以相同速率稳定进料、出料的条件下，反应器有效体积、反应物系组成均不随时间发生变化。物料进入反应器后，瞬间就在整个反应器内分散均匀并与器内原存留的物料完全混合，并与出料组成相同。其混合情况是：空间混合 = ∞；返混 = ∞（图 6-12）。

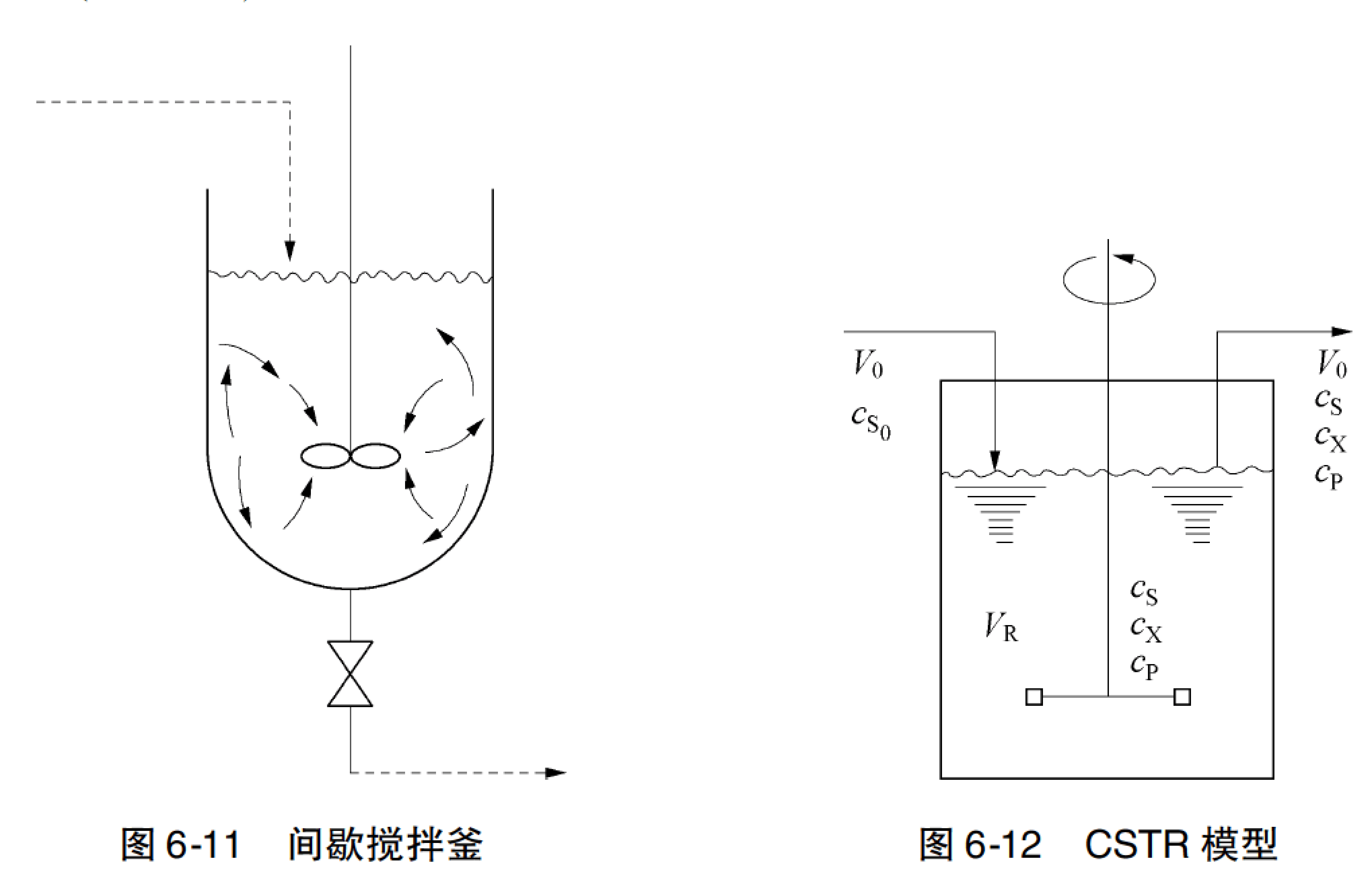


图 6-11　间歇搅拌釜　　　　图 6-12　CSTR 模型

1）CSTR 基本特征：CSTR 的特点为：反应器内以及出口物料的组成和温度等参数均匀一致，且不随时间、空间而变化；各物料微元在器内的停留时间不尽相同，存在停留时间分布。

在实际反应器中，带强烈搅拌的连续釜式反应器内物料的流况就近似于这种流动模型。此外，沸腾床中的固相颗粒运动，长径比较大的鼓泡塔中的液相流动，大循环量的连续反应器的流体流动等，也都趋近于这种流动模型。

假定 CSTR 中进行等温均相反应，反应器有效体积恒定不变，其基本设计方程为：流入速率 = 流出速率 + 反应消耗速率 + 积累量。

对底物 S 的物料衡算式为

$$v_0 c_{S_0} = v_0 c_S + r_S V_R + \frac{dc_S}{dt} V_R \tag{6-19}$$

式中：V_0 为进料流量；c_{S_0}、c_S 为进、出反应器物料的底物浓度；V_R 为反应器有效体积。

在连续稳定态时，$\frac{dc_S}{dt}=0$，由上式可得：

$$\tau_m = \frac{V_R}{v_0} = \frac{c_{S_0} - c_S}{r_S} \tag{6-20}$$

式中，τ_m 为 CSTR 的空时，等于物料在反应器中的平均停留时间，S_0 是空时的倒数，也称为空速（s^{-1}），可用以表示单位反应器体积的物料处理能力。

2）CSTR 的停留时间分布：理想混合的假定是反应物料以恒定速率进入反应器，新鲜粒子与存留在反应器内的粒子能在瞬间达到完全混合，反应器内各处流体性质相同，且与反应器出口流体性质相同。反应器内各处浓度是相同的，但粒子在器内的停留时间是不同的，出口粒子的停留时间存在最宽的分布。以下以阶跃注入法讨论全混流的流型。

在时间 dt 内，加料中示踪剂浓度为 c_0，物料流量为 F，则加入设备的示踪剂量为 $c_0 F dt$。出口处示踪剂浓度为 c，示踪剂总量为 $cFdt$，此时设备内示踪剂浓度变化为 dc。累积为 $V_R dc$。对设备做示踪剂的物料衡算：

$$\frac{dc}{dt} = \frac{F}{V_R}(c_0 - c) = \frac{1}{\bar{t}}(c_0 - c) \tag{6-21}$$

式中：$t \leqslant 0$ 时，$c=0$；$t \to \infty$ 时，$c \to c_0$。按此初始条件对上式进行积分，得到停留时间分布函数

$$F(t) = c/c_0 = 1 - e^{-t/\bar{t}} \tag{6-22}$$

或

$$F(\theta) = 1 - e^{-\theta} \tag{6-23}$$

对上式求导可得：

$$E(t) = \frac{1}{\bar{t}} e^{-t/\bar{t}} \tag{6-24}$$

$$E(\theta) = e^{-\theta} \tag{6-25}$$

按此式计算的曲线如图 6-10 CPFR 的虚线。由式（6-21）可知，当 $F(t)=1$ 时，$e^{-t/\bar{t}}=0$，即 $t \to \infty$。因此，图 6-10 中 $F(t)=1$ 为此虚线的渐近线。这意味着少量粒子在器内停留时间很长。当 $\bar{\theta}=1$ 时，由式（6-22）可知 $F(t)=1-e^{-1}=0.632$。表明设备内有 63.2% 的示踪剂停留时间小于平均停留时间。

6.2.2　非理想反应器的流动模型

如前所述，在理想流动状况下，流体完全无返混或完全返混，而实际反应器中流体的返混情况介于两者之间。实际反应器中流动状况偏离理想流动的原因有：①存在滞流区。滞流

区指反应器中流体流动极慢以至于几乎不流动的区域，因此又称为死区。滞流区的存在使得一部分流体的停留时间极长，其停留时间分布密度函数 $E(t)$ 曲线拖尾很长。滞流区主要产生于设备死角中，如设备两端、挡板与设备交接处等。②存在沟流与短路。对某些反应器，例如以固定化酶为催化剂的填充床反应器，由于固定化酶颗粒装填不匀，从而造成一低阻力通道，使得部分流体快速地从此通道流过，从而形成沟流。短路也会造成流体在设备内的停留时间极短。存在沟流和短路时，反应器的停留时间分布密度函数 $E(t)$ 曲线一般存在双峰，第一个峰即为沟流或短路造成的。并且，实测的停留时间分布所计算出的平均停留时间要小于时间参数，而在无沟流或短路、有滞流区时，则会出现相反情况。③存在循环流。鼓泡塔、机械搅拌反应器和硫化床内都有可能存在流体的循环运动，尤其是在一些新型反应器内设置的导流措施在强化传质的同时也强化了流体的循环流动。存在循环流时，停留时间分布曲线出现多峰现象。此外，造成非流动的原因还有：由于流体流速分布不均匀造成流体在反应器内的停留时间有长有短；由于分子扩散及涡流扩散的存在而造成流体粒子之间的混合，从而使停留时间分布偏离理想流动（图 6-13）。

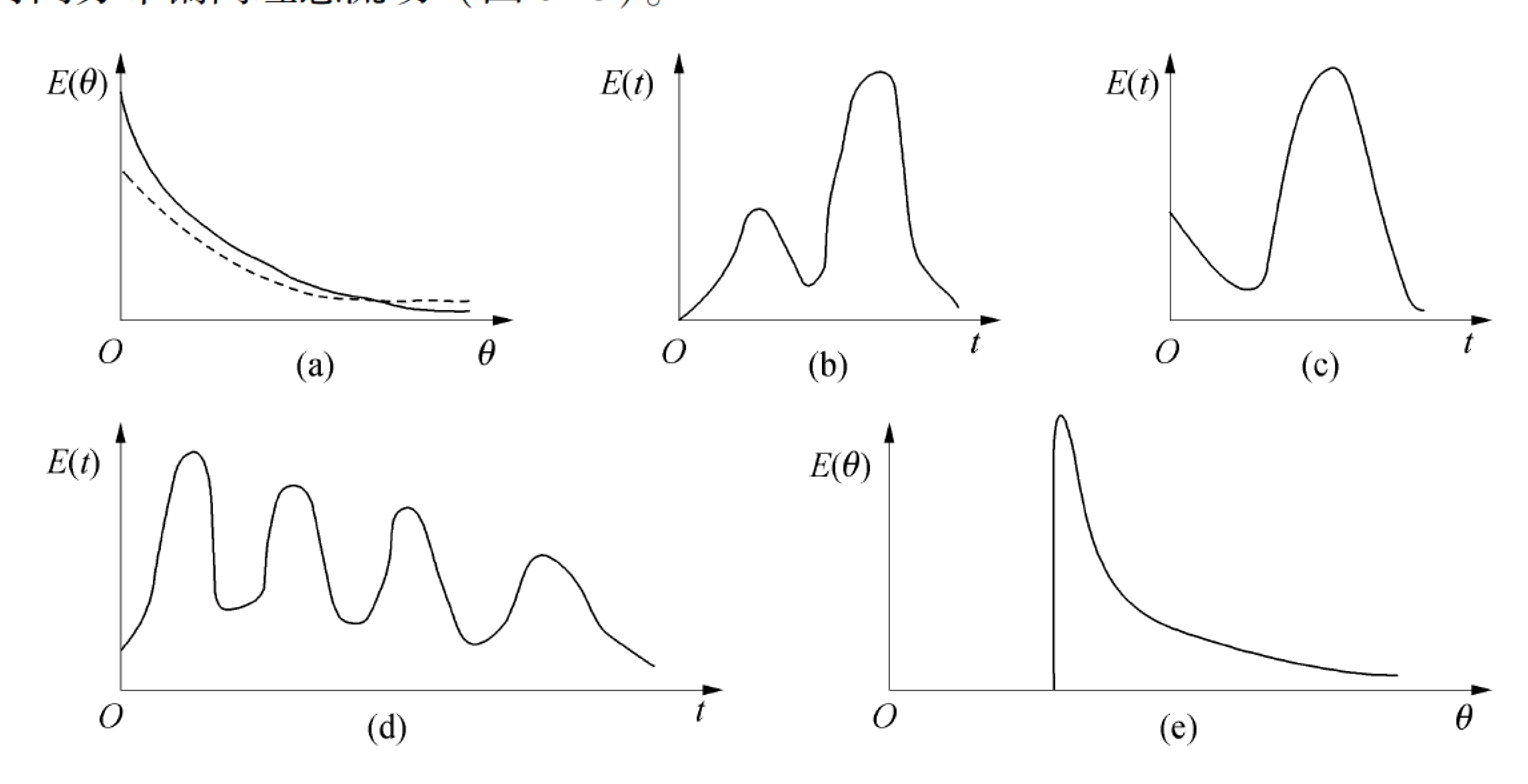


图 6-13　几种非理想流动的停留时间分布曲线

（a）滞流；（b）沟流；（c）短路；（d）循环流；（e）层流

以上不符合理想流动状况的流动称为非理想流动，一般无法对其过程进行有效的描述，只能根据其流动状况和实测的停留时间分布，借助于对理想流动模型的修正，或多种模型的组合建立非理想流动模型进行处理。目前，非理想流动的模型很多，以下介绍凝集流模型、轴向扩散模型、槽列模型和组合模型。

1. 凝集流模型　它是非理想流模型之一，其基本假定是：物料在反应器内以流体元形式存在；流体元各自以不同的停留时间通过反应器，且彼此无物质交换；每个流体元可视为一个小间歇反应器，各流体元停留时间不相同，与各小间歇反应器在不同反应时间下操作类似；出口流的参数将是各流体元中参数的均值。

流体元是指流体流动的最小独立单元，它可以是分子，也可以是分子集团。流体元是分子的情况，即流体以分子状态均匀分散于系统中，这种流体叫分散流体，也叫微观流体。一般均相气体属于微观流体。微观流体的流体元以分子状态相混合，称为微观混合。流体元是分子集团，即流体的分子聚集成微小的集团存在于系统之中，这种局部分子聚集成团的现象叫凝集。流体流动的最小单元是凝集的分子集团，这种流体叫凝集流体，也叫宏观流体。宏

观流体以分子集团的状态相混合，称为宏观混合（关于混合理论，详见 6.3.1 节）。

在凝集流模型中，流体元是由一定量的分子组成的，流体元在反应器内与其他流体元不发生质量交换，亦即成为一个小的间歇反应器，而间歇反应器内物料反应的情况是可以计算的。出口流中物料由不同停留时间的流体元组成。显然出口流中物料的平均转化率是各凝集元（流体元）中物料转化率的平均值，即：

$$\overline{x_A} = \sum_{0}^{\infty}(\text{停留时间在 } t + \mathrm{d}t \text{ 之间流体元达到的转化率}) \times (\text{停留时间在 } t \text{ 和 } t + \mathrm{d}t \text{ 之间流体元的分率})$$

式中的加和，包括所有可能的停留时间。

若停留时间分布是连续函数，可写成积分形式：

$$\overline{x_A} = \int_0^1 x_A(t)\mathrm{d}F(t) = \int_0^\infty x_A(t)E(t)\mathrm{d}t \tag{6-26}$$

此式即是凝集流模型求解反应器转化率的计算式。

2. 轴向扩散模型　是仿照一般分子扩散中用扩散系数来表征的情况，它用一个所谓的“有效扩散系数”来表征一维返混情况，也就是认为非理想流动的管形反应器中物料的返混是由于其流动是在平推流流动的同时叠加了一个涡流扩散流动所造成的。由于分子扩散，涡流扩散及流速分布的不均匀等原因，造成系统的流动状况偏离理想流动时，可用轴向扩散模型来模拟。这个模型适用于偏离平推流较小的非理想流动，主要用于湍流流动的管形反应器、固定床反应器和塔式反应器。

其基本假定有：①流体沿轴向有参数变化，径向参数均一；②流体流动主流为平推流但叠加一逆向涡流扩散；③逆向涡流扩散遵循 Fick 定律，且在整个反应器内轴向扩散系数（用符号 E 表示）为一常数。

1）模型基础方程：根据上述假设，可建立轴向扩散模型的数学方程式。由于该系统为一分布参数系统，选取一微元体做示踪剂的平衡。基础方程如图 6-14 所示，流体以流速 u 通过管形反应器中一体积单元（该体积单元为管截面积 S_t 及长度 $\mathrm{d}l$ 所含体积）。对该体积单元进行物料衡算。

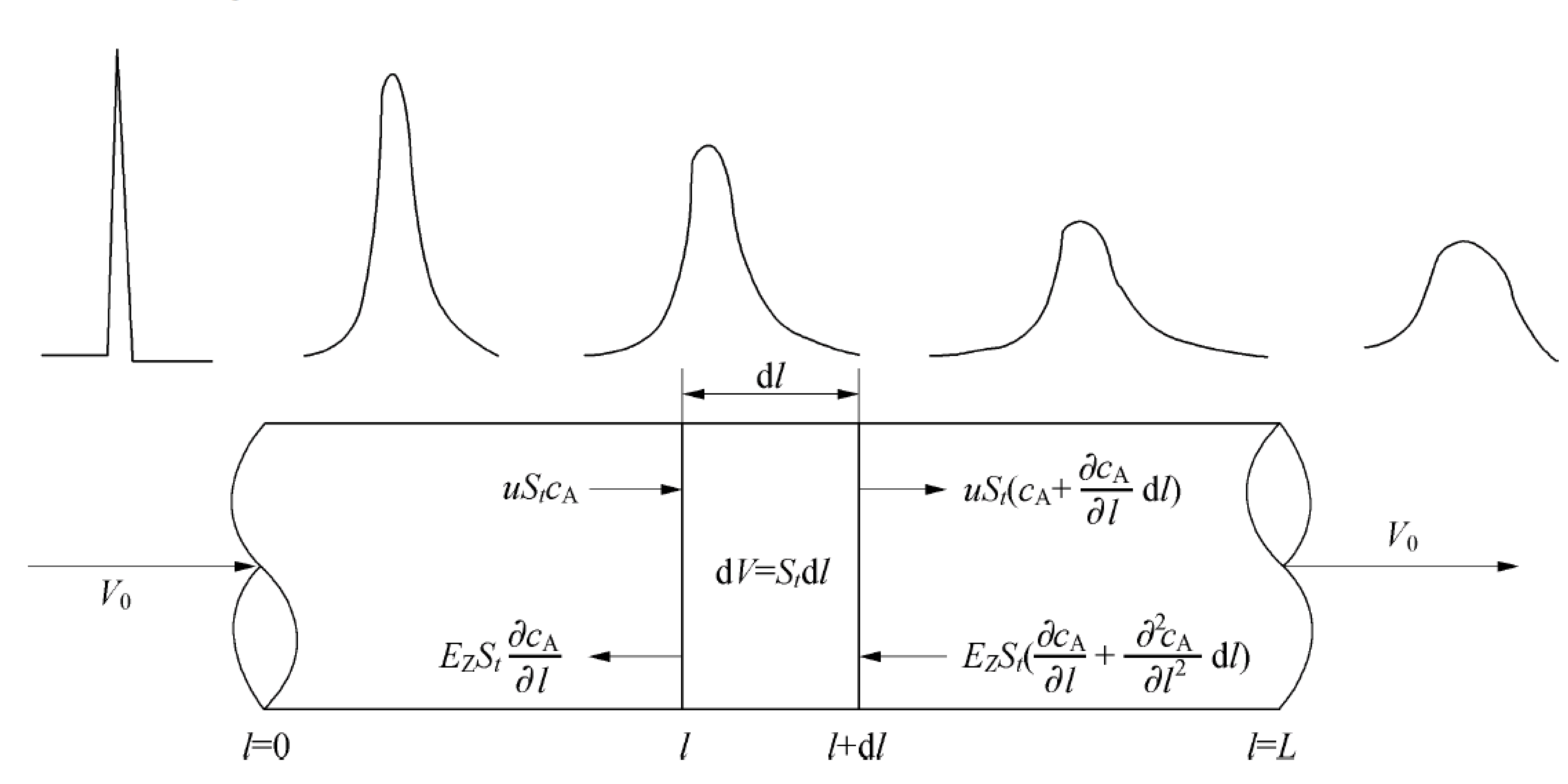


图 6-14　轴向扩散模型物料衡算示意图

进入量：

主流体流入量：　　　　$S_tV_0c_A$

逆向扩散进入量： $E\frac{\partial}{\partial l}\left(c_A+\frac{\partial c_A}{\partial l}dl\right)S_t$

流出量：

主流体流出量： $S_t u\left(c_A+\frac{\partial c_A}{\partial l}dl\right)$

逆向扩散流出量： $E\frac{\partial c_A}{\partial l}S_t$

反应消耗量： $-r_A S_t dl$

积累量： $\frac{\partial c_A}{\partial t}S_t dl$

A 组分的物料衡算为：

输入量 - 输出量 = 反应消耗量 + 积累量

将上述关系代入并经整理后得：

$$E\frac{\partial^2 c_A}{\partial l^2}-u\frac{\partial c_A}{\partial l}-\frac{\partial c_A}{\partial t}-(-r_A)=0 \tag{6-27}$$

式（6-27）为轴向扩散模型的基础方程。

2）轴向扩散模型的停留时间分布规律：轴向扩散模型的基点是在管形反应器中流体的流动是平推流，再叠加一逆向涡流扩散。由于有逆向涡流扩散，故流体的流动属非理想流动，对该反应器的停留时间分布规律的测定采用阶跃注入法，示踪剂不参与反应，故基础方程为

$$E\frac{\partial^2 c_A}{\partial l^2}-u\frac{\partial c_A}{\partial l}-\frac{\partial c_A}{\partial t}=0 \tag{6-28}$$

解此方程的边界条件将根据流体流入及流出反应器的情况不同可分为开 - 开式、闭 - 闭式、开 - 闭式及闭 - 开式 4 种。上述 4 种边界条件中第一个字是指物料进入反应器的条件，第二个字指物料流出反应器的条件。

开式边界条件是指边界处或测试点处与反应器内流体的流动形态没有突然变化，这相当于反应器无限长管中的一段。反应器内流动特征将扩展到反应器进出口处。闭式边界条件指边界处或测试点处与反应器内流体流动型态存在突然变化，一般是进口管内（或出口管外）流体的流型与反应器内流体流型不同。

开 - 开式边界条件是流体在进口处及出口处均属开式条件，如图 6-15（a）所示；开 - 闭式边界条件是流体进口处属开式条件，出口处属闭式条件，如图 6-15（b）所示；闭 - 开式边界条件是流体在进口处属闭式条件，出口处属开式条件，如图 6-15（c）所示；闭 - 闭式边界条件是流体在进口处及出口处均属闭式条件，如图 6-15（d）所示。

3. 槽列模型 又称多级 CSTR 串联模型。该模型比较简单，任何动力学方程均可应用。当有多个 CSTR 反应器串联时，它的性能介于平推流和全混流之间，并且串联的反应器愈多，愈接近于平推流。因此，可以用 N 个串联的全混流模型来模拟一个实际的反应器。N 为该模型的参数，$N=1$ 时为全混流，$N=\infty$ 时其效果与 CPFR 一样，流型接近 CPFR。N 的取值不同，反映了实际反应器的不同返混程度，N 的数值由其停留时间分布来确定。为此首先要确定多级 CSTR 串联时的停留时间分布。槽列模型如图 6-16 所示。

1）槽列模型的基本假设：①它由 N 个大小相等容积为 V_{R_i} 的 CSTR 串联组成；②从一个

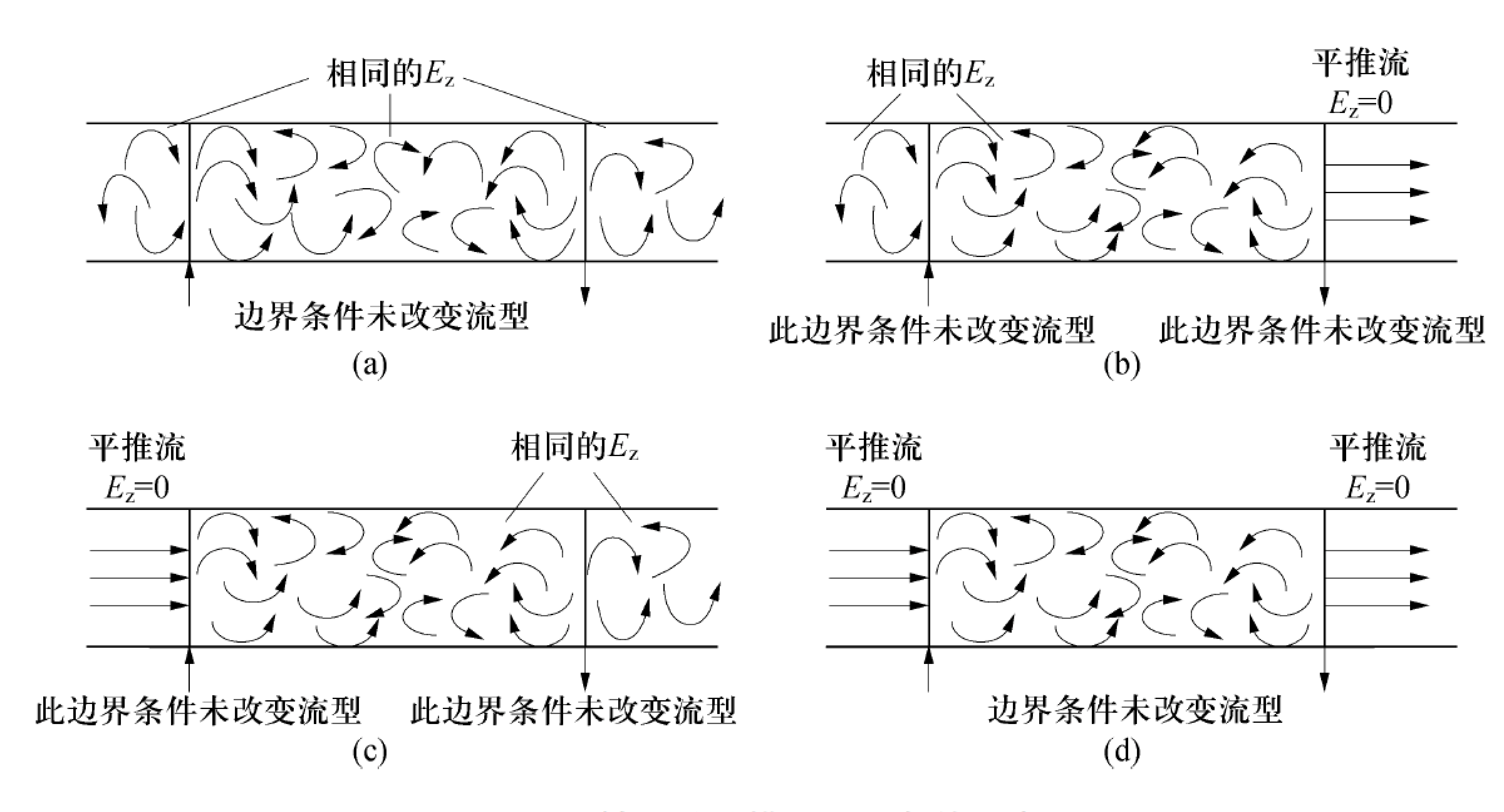


图 6-15　轴向扩散模型边界条件示意图

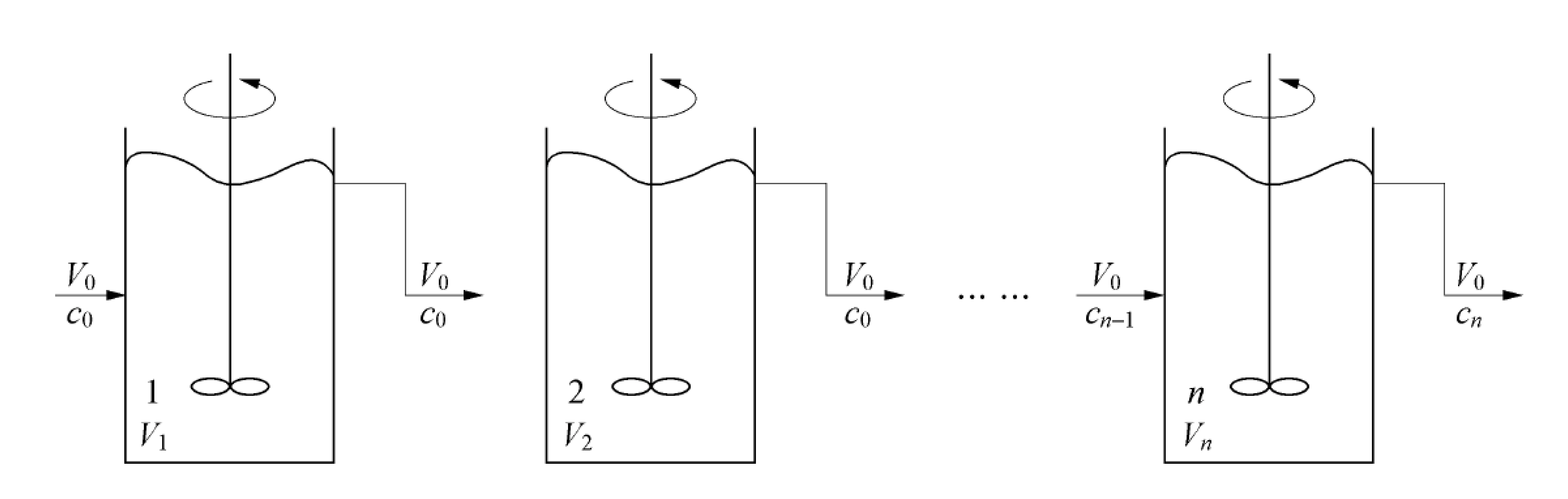


图 6-16　槽列模型示意图

CSTR 到下一个 CSTR 之间的管道内物料不发生反应。

2）模型的计算：反应器中基本参数如图 6-16 所示，采用阶跃输入法测定停留时间分布规律，在时间为 t 时，第 i 个反应器的示踪剂物料衡算为

$$\text{输入量} = Vc_{i-1},\quad \text{输出量} = Vc_i,\quad \text{积累量} = V_{\mathrm{R}_i}\frac{\mathrm{d}c_i}{\mathrm{d}t}$$

则：
$$Vc_{i-1} - Vc_i = V_{\mathrm{R}_i}\frac{\mathrm{d}c_i}{\mathrm{d}t} \tag{6-29}$$

若每个 CSTR 的容积为 V_{R_i}，N 个 CSTR 的总容积为 NV_{R_i}。

令：
$$\theta = \frac{t}{\left(\dfrac{NV_{\mathrm{R}_i}}{V_0}\right)} \tag{6-30}$$

则式（6-28）可写成：
$$\frac{\mathrm{d}c_i}{\mathrm{d}\theta} + Nc_i = Nc_{i-1} \tag{6-31}$$

用此方程可求出示踪剂出第 N 个釜时的浓度，因为是采用阶跃输入法测定停留时间分布规律，有：
$$F(\theta) = \frac{c_N}{c_0}$$

第 N 个容积为 V_{R_i}的 CSTR 串联组成的反应器的停留时间分布规律为

$$F(\theta)=\frac{c_N}{c_0}=1-\exp(-N\theta)\left[1+\frac{1}{1!}N\theta+\frac{1}{2!}(N\theta)^2+\frac{1}{3!}(N\theta)^3+\cdots+\frac{1}{(N-1)!}(N\theta)^{(N-1)}\right] \tag{6-32}$$

$$\begin{aligned}E(\theta)=\frac{\mathrm{d}F(\theta)}{\mathrm{d}\theta}&=N\exp(-N\theta)\left[1+\frac{1}{1!}N\theta+\frac{1}{2!}(N\theta)^2+\frac{1}{3!}(N\theta)^3+\cdots+\frac{1}{(N-1)!}(N\theta)^{(N-1)}\right]\\&\quad-N\exp(-N\theta)\left[1+\frac{1}{1!}N\theta+\frac{1}{2!}(N\theta)^2+\frac{1}{3!}(N\theta)^3+\cdots+\frac{1}{(N-2)!}(N\theta)^{(N-2)}\right]\\&=\frac{1}{(N-1)!}(N\theta)^{(N-1)}\exp(-N\theta)=\frac{N^N}{(N-1)!}\theta^{(N-1)}\exp(-N\theta)\end{aligned} \tag{6-33}$$

$$\bar{\theta}=\int_0^\infty \theta E(\theta)\mathrm{d}\theta=\int_0^\infty\frac{N^N}{(N-1)!}\theta^N\exp(-N\theta)\mathrm{d}\theta=1 \tag{6-34}$$

$$\begin{aligned}\sigma_\theta^2&=\int_0^\infty(\theta-\bar{\theta})^2E(\theta)\mathrm{d}\theta=\int_0^\infty\theta^2E(\theta)\mathrm{d}\theta-\bar{\theta}^2\\&=\int_0^\infty\frac{N^N}{(N-1)!}\theta^{N+1}\exp(-N\theta)\mathrm{d}\theta-\bar{\theta}^2=\frac{N^N}{(N-1)!}\frac{(N+1)!}{N^{N+2}}-1=\frac{1}{N}\end{aligned} \tag{6-35}$$

N 为不同值时的 $E(\theta)-\theta$ 及 $F(\theta)-\theta$ 曲线如图 6-17 所示。

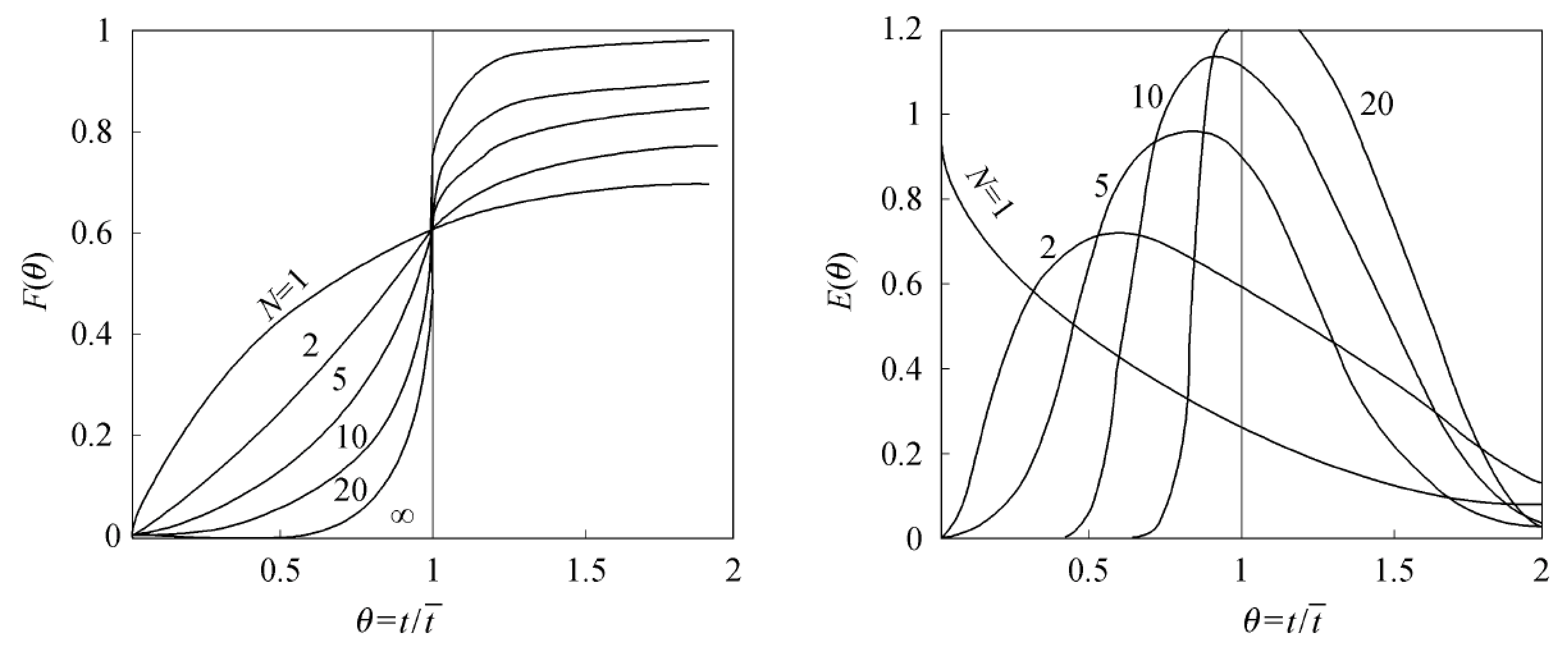


图 6-17　不同 N 值时的 $F(\theta)-\theta$ 和 $E(\theta)-\theta$ 曲线

当 $N=1$ 时，槽列模型的停留时间分布函数与 CSTR 相同；当 $N\to\infty$ 时，槽列的停留时间分布函数与 CPFR 相同；在 $1<N<\infty$ 时，槽列模型的停留时间分布函数属非理想流动反应器。

3）槽列模型的应用：多个 CSTR 串联操作时，当釜数由 1 个增加到无限多个，其停留时间分布规律将按 CSTR→非理想流动反应器→CPFR 的停留时间分布规律变化。显然，如果釜数选择恰当，该模型的停留时间分布规律可以与任一个非理想流动反应器的停留时间分布规律接近，且可使两者返混程度相同。非理想流动反应器的出口转化率无法计算，而槽列模型的出口转化率是可以计算出来的。既然两者返混程度相同，则出口转化率也应大致相同。故将槽列模型计算出的出口转化率视为与它有相同停留时间分布规律的非理想流动反应器的出口转化率，这种模型与实际情况之间的相互联系称等效关系。

现在的问题是某一非理想流动反应器在停留时间分布规律上究竟与多少个釜串联的 CSTR 等效？从槽列模型的特征值 $\sigma_\theta^2=1/N$，可求出所需釜数，即：

$$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2} = \frac{\bar{t}^2}{\sigma_t^2} \tag{6-36}$$

值得注意的是，槽数 N 是一个虚拟的值，从物理意义上说，N 是人为地把一个非理想反应器想象成 N 个 CSTR 的串联；而 σ_θ^2 则是实验测定值，是上述非理想反应器停留时间分布规律的真实表达。σ_θ^2 的取值范围为 0 ~1。$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2}$ 不是整型数，而是一个实型数。譬如说，N =2.07 意味着这个反应器的停留时间分布规律与 2.07 个全混流釜串联的结果相当。在 $E(\theta)$、$F(\theta)$ 计算中出现的 2.07！可以通过 Γ 函数递推公式求得。

4. 组合模型　对于许多实际反应器，上述模型有时还不能令人满意地表达其流动状况，为此，提出多参数的种种组合模型。它是把真实反应器内的流动状况设想为若干种简单模型的组合，譬如由平推流、全混流、死区、短路和循环流等组合而成，有的还加上错流、时间滞后等因素构成多种模型。由于组合模型中各单独部分的时间分布函数 $E(t)$ 和 $F(t)$ 均已知，因此各组合模型的有关函数亦可推导出来。例如机械搅拌反应器，对体积较大的工业规模反应器，反应器内液体流动状况肯定是要偏离完全混合流动，因此必须考虑不完全混合的因素。

Cholette 考虑了对理想连续搅拌反应器偏离的可能性：存在反应物料不与反应器内物料相混合的短路流；另外，反应器内有死区存在。这些都是对反应无用的区域。剩余的反应体积内的物料则为全混流。这样建立的模型包括 3 个参数，即短路流量与总流量之比、反应器中的死区和全混流区体积，因此组合模型又称为多参数模型或结构模型（图 6-18）。同样可根据示踪剂的物料平衡求出其停留时间分布。

$$F(t) = \frac{V_A}{V_0}\left[1 - \exp\left(-\frac{V_A}{V_{RA}}t\right)\right] + \frac{V_B}{V_0} \tag{6-37}$$

对上式取对数，通过作图可估算出 V_B 和 V_{RA} 值，这样即可确定各部分体积和流量值。

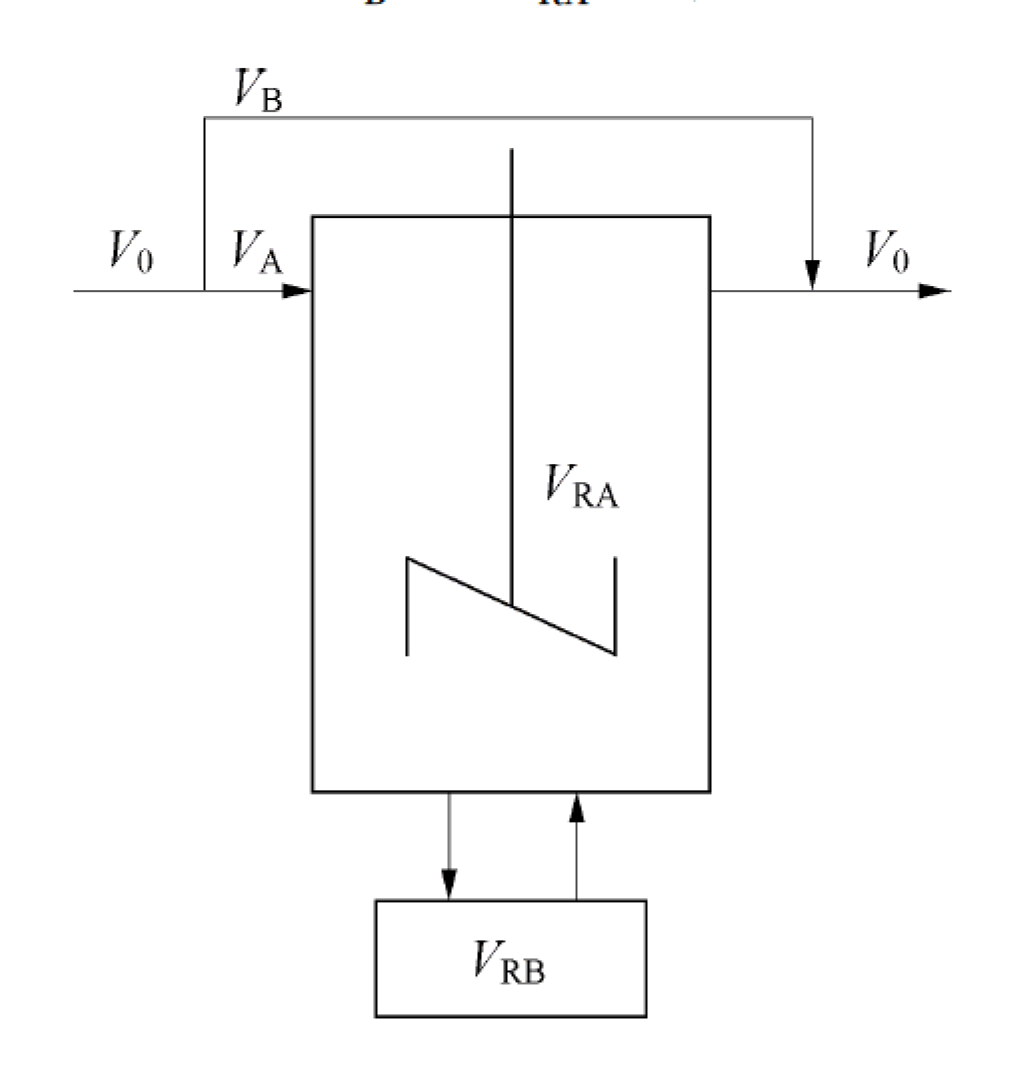


图 6-18　考虑死区和短路的组合模型

V_0 为总流量，V_A 为进入反应器进行全混流的流量，V_B 为短路流量，V_{RA} 为全混流区体积，V_{RB} 为死区体积

5. 模型法进行均相反应过程计算小结　在生物反应过程计算中，由于过程复杂，很难直接取得定量计算结果。通常采用近似解法，目前最常用的方法是模型法。用模型法解决生物反应工程问题的出发点是：尽管在反应器内物料同时存在生物反应过程和传递过程，但生

物反应过程有其自身的规律，并不会因存在传递过程而有所改变。同样，传递过程的规律也不因生物反应的存在而改变。但两者在反应器内并不是完全独立的。例如，由于传递过程的存在，使物料在反应器内各处参数（如温度及物料组成）不同，不同的参数值虽不会影响生物反应动力学方程本身，但不同参数在同一动力学方程中得到的生物反应速率值是不同的。同样，生物反应的存在将改变物料的温度和浓度分布，进而使传递速率值不同。也就是说，生物反应的存在改变不了传递速率方程，传递过程的存在也不会改变生物反应动力学方程。只有这样才有可能将反应器内的生物反应过程与传递过程分别独立地加以研究，然后根据反应器内物料及其流动特性加以综合考虑，获得所需要的定量结果。

用模型法解决生化反应工程问题的步骤如下。

（1）小试研究生物反应规律：基于生物反应不受传递过程影响，由于反应规律是独立的，即无论采用何种类型反应器，其生物反应规律不变，因此可以在选择反应器类型之前先加以测定。在测定生物反应规律时选用的反应器最好是传递规律简单、在取样分析其组成时不会对过程有影响、用较少的实验便能获得所需结果的反应器，因此通常用间歇操作的带充分搅拌的槽式反应器。在小试中要根据原料组成和反应一定时间后产品的组成用反应计量学来确定反应类型，同时推演出各反应的动力学方程。这将为合理选择反应器类型及定量计算反应器的大小奠定基础。

（2）根据生物反应规律合理选择反应器类型：根据生物反应规律即其反应类型以及各个反应的动力学方程（活化能及反应级数的数值）便可以初步确定反应器的类型。

（3）大型冷模试验研究传递过程规律：冷模试验的反应器可以是最终反应器，也可以是能代表最终反应器传递特性的基本单元。由于只测定其传递特性，冷模试验并不需要反应过程存在，因此不一定选择反应物料作工况介质，冷模试验的工况介质可以选用价廉、易得、性能良好的物料（如无毒、不燃等）作工况介质，如液体可取水而气体取空气。

在均相反应系统中传递特性基本上可用物料在反应器内停留时间分布规律来归纳。反应器内物料的停留时间分布规律测定及计算在前面已做了详细介绍。

（4）利用计算机或其他手段综合反应规律和传递规律，预测大型反应器性能，寻找优化条件：均相反应器中物料的流动特性大体可分为理想流动（无返混的平推流和充分返混的全混流）和非理想流动。对于非理想流动需要选择适合的流动模型来进行模拟。

（5）热模试验检验模型的等效性：在最终选定的反应器内（或与冷模试验相同的基本单元内）按实际操作条件进行操作，将实验取得的数据与步骤（4）计算结果相比较。若两者吻合较好，说明上述计算正确。若实验值与计算值相差较大，说明步骤（4）选定的模型不合适，需另行选择，直到两者较为吻合为止。

用模型法解决生物反应工程问题只是得出近似解，因为模型与实际情况之间存在差异，使模型计算的结果与实际情况结果不完全相同，因此要用热模试验加以验证。此外，对某一问题可能有多个模型可被选用，例如非理想流的计算有凝集流模型、槽列模型、轴向扩散模型等，对同一实际情况用不同模型计算结果存在差异，有的差异很大，故合理选择模型也是至关重要的。

6.3　生物反应器中的搅拌与混合

6.3.1　混合的基本理论

1. 调匀度　设有 A、B 两种液体，各取体积 V_A 及 V_B 置于同一容器中，A 与 B 不发生化学反应，忽略两种液体互溶造成的体积变化，则容器内液体 A 的平均体积分数为

$$F_{A_0} = \frac{V_A}{V_A + V_B} \tag{6-38}$$

经过一定时间的搅拌，在容器中各处取样分析。若各处样品的分析结果一致，皆等于 F_{A_0}，表明已搅拌均匀，若分析结果不一致，则表明尚未搅拌均匀。样品的体积分数 F_A 与平均体积分率 F_{A_0}偏离越大，均匀度越差。引入调匀度的概念来表示样品与均匀状态的偏离程度。定义某一样品的调匀度 I 为

$$I = \frac{F_A}{F_{A_0}} \tag{6-39}$$

显然，调匀度 $1 \geqslant I \geqslant 0$。

若对全部样品的调匀度取平均值，可得平均调匀度。平均调匀度可用以度量流体的混合效果，即均匀程度。当混合均匀时，平均调匀度为 1。

但单凭调匀度并不足以说明物料的实际混合程度。例如，设有 A、B 两种液体通过搅拌达到如图 6-19 所示的两种状态。在两种状态下，液体 A 都已成微团均匀分布于另一种液体 B 中，但液体微团的尺寸却相差很大。如果取样体积大于微团尺寸，每一样品皆包含众多的微团，则两种状态的分析结果将相同，平均调匀度都应接近于 1。但是，如果样品体积小到与图 6-19 两种微团的均匀状态（b）中的微团尺寸相近，则图 6-19 两种微团的均匀状态（b）所示状态的平均调匀度将明显下降，而图 6-19 两种微团的均匀状态（a）所示状态的调匀度仍可保持不变。即同一个混合状态的调匀度是随所取样品的尺寸而变的，说明单凭调匀度不能反映混合物的状态。

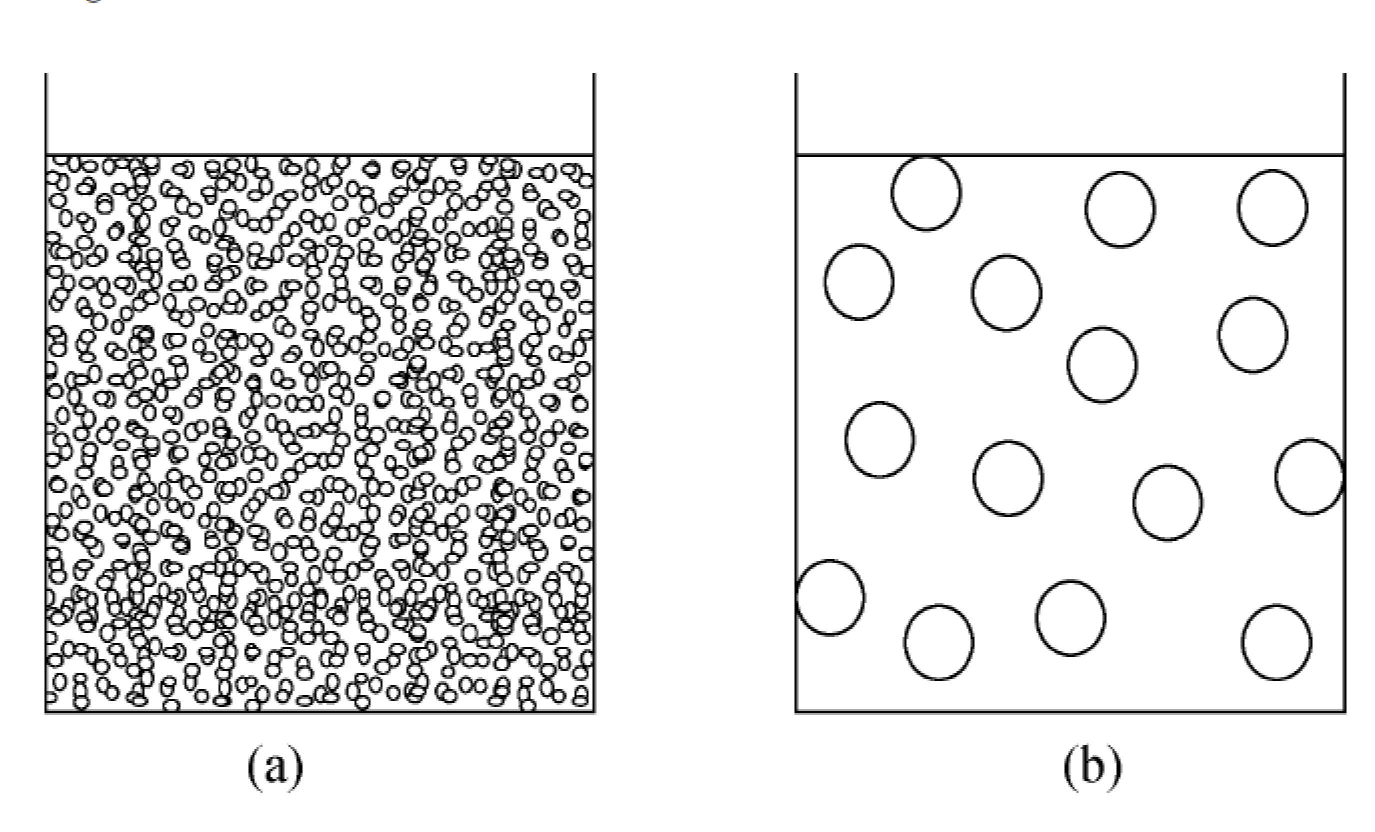


图 6-19　两种微团的均匀状态

对图 6-19 两种微团的均匀状态所示的两种状态，从设备尺度上来考察，两者都是混合均匀的，这样的状态称为宏观的均匀。当考察尺度小时，如在微团尺度上，则两者具有不同的调匀度。如从分子尺度上考察，两者都是不均匀的。只有微团消失，才称得上分子尺度的均匀或微观的均匀。

对于互溶液体，搅拌越剧烈，液体微团尺寸越小，可在更小的尺度上达到混合均匀。当液体微团消失时，可达到分子尺度上的均匀。对于不互溶液体，无论搅拌如何强烈，也只能将其中一种液体破碎成细小液滴，不可能达到分子尺度上的均匀。液体搅拌得越剧烈，液滴尺寸越小，分散程度越高。至于液固系统，通过搅拌只能期望达到某种宏观上的均匀。因为再强烈的搅拌，也无力改变固体颗粒的尺寸。

2. 混合机制

1）大尺度的混合机制：将两种不同的液体置于搅拌釜中，启动搅拌器，釜中形成一个循环流动，称为总体流动。在总体流动的作用下，其中一种流体被分散成一定尺寸的液团并由总体流动带至容器各处，造成大尺度上的均匀混合。大尺度的均匀混合并不关注液团的尺寸，重要的是将产生的液团分布到容器的每一个角度。这就要求搅拌器能够产生强大的总体流动，同时在搅拌釜内尽量消除流动达不到的死区。总体流动的流型相当复杂，不同形式的搅拌器各不相同。最典型的螺旋桨式搅拌器和涡轮式搅拌器所形成的流型结构分别如图 6-20（a）和（b）所示。与涡轮式搅拌器相比，螺旋桨式搅拌器可提供更大的流量，特别适用于要求大尺度混合均匀的搅拌。

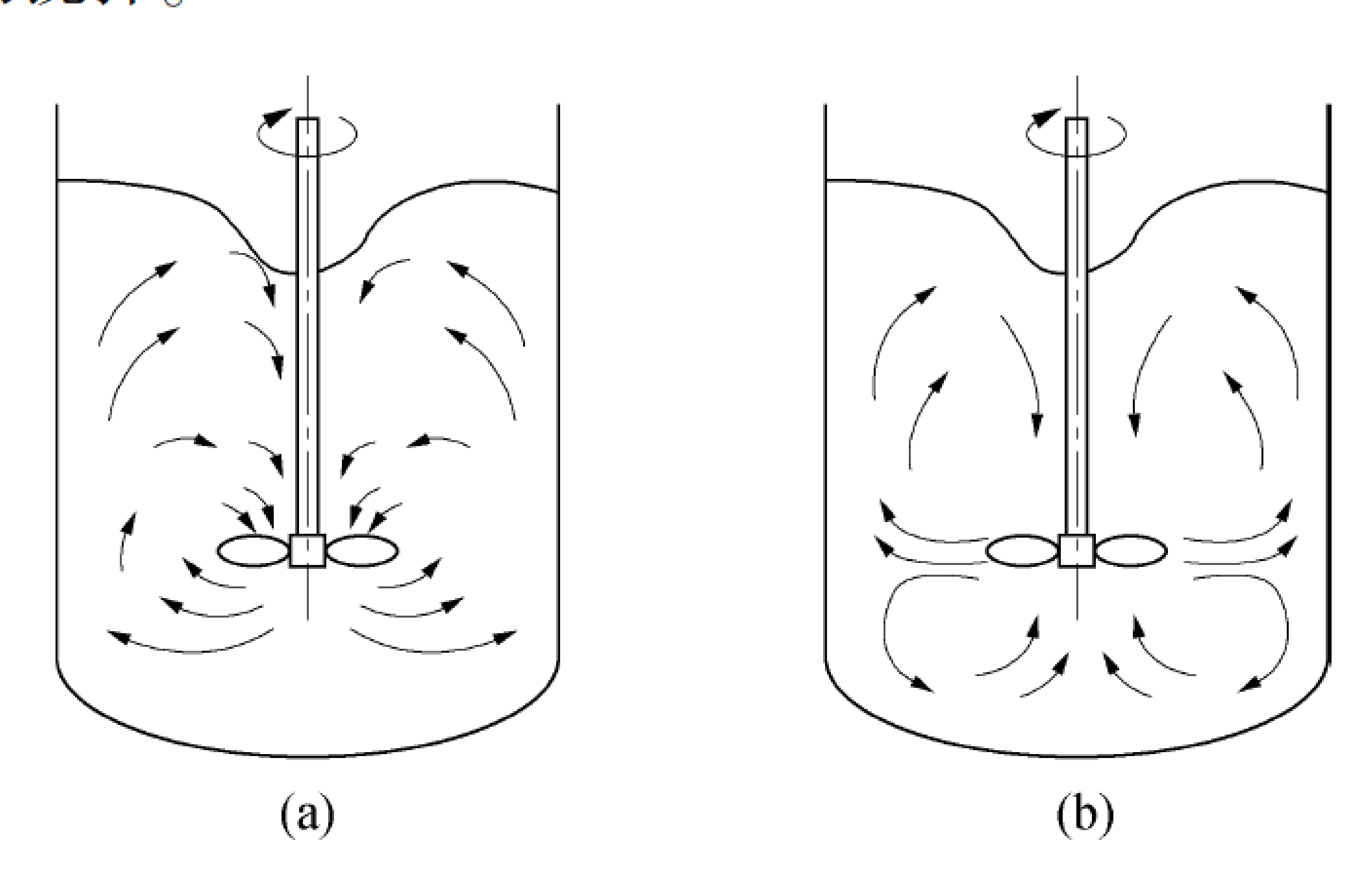


图 6-20　两种搅拌器的流型

（a）螺旋桨式搅拌器；（b）涡轮式搅拌器

2）小尺度的混合机制

（1）互溶液体的混合机制：总体流动可将混合液体中的一种液体破碎成较大的液团，并同时将这些液团夹带至容器各处，造成宏观上的均匀。但单靠总体流动不足以将液团破碎到很小尺寸。尺寸很小的液团是由总体流动中的湍动造成的，湍流可看成是由平均流动与大量不同尺寸、不同强度的旋涡运动叠加而成。总体流动中高速旋转的旋涡与液体微团之间会产生很大的相对运动和剪切应力，液团正是在这种剪切应力的作用下被破碎得更加细小。

不同尺寸和不同强度的旋涡对液团有不同的破碎作用。旋涡尺寸越小，破碎作用越大，所产生的液团也越小。大尺度的旋涡只能产生较大尺寸的液团，因为尺寸较小的液团将被大旋涡卷入与其一起旋转而不被破碎。

旋涡的尺寸和强度取决于总体流动的湍动程度。总体流动的湍动程度越高，旋涡的尺寸越小，强度越高，数量越多。因此，为达到更小尺度上的均匀混合，除选用适当型号的搅拌器外，还可以采用其他措施促进总体流动的湍动。

液体的破碎并非搅拌器直接打击的结果。搅拌器的作用，只是向液体提供能量，造成高度湍动的总体流动。液体的破碎不是发生在搅拌器的桨叶上，而主要发生在搅拌釜内高度湍动的流区里。

液体微团的大小，取决于旋涡尺寸。在通常的搅拌条件下，微团的最小尺寸为几十微米。因此，单凭机械搅拌是不可能达到分子尺度的均匀的。微团的最终消失，只能靠分子扩散。显然这已不属于搅拌的范畴。但是搅拌可以减小微团的尺寸，使达到分子均匀所需的扩散时间大大缩短。

（2）不互溶液体的混合机制：两种不互溶液体搅拌时，其中必有一种液体被破碎成液滴，称为分散相；而另一种液体称为连续相。

为达到更小尺度的均匀混合，必须尽可能减小液滴尺寸。同样，总体流动只能产生较大的液滴。当液滴小到一定程度，总体流动对液滴的进一步破碎已无能为力，而只能依靠湍流脉动。液滴是一个具有明显界面的液团。界面张力力图使液滴的表面面积最小，抵抗任何变形和破碎。因此，对液体搅拌而言，界面张力是过程的抗力。为使液滴破碎，首先必须克服界面张力，使液滴变形。

当总体流动处于高度湍动状态时，存在着方向迅速变换的湍流脉动，液滴不能跟随这种脉动而产生相对速度很大的绕流运动。这种绕流运动，沿着流滴表面产生不均匀的压强分布和表面剪切应力。正是这种不均匀的压强分布和表面剪切应力将液滴压扁并扯碎。总体流动的湍动程度越高，湍流脉动对液滴绕流的相对速度越大，产生的液滴尺寸越小。

（3）液滴大小的分布：液滴尺寸的大小决定于总体流动的湍动程度。对一定的搅拌过程，总体流动的湍动程度一定，可能达到的最小液滴尺寸亦随之而定。由此看来，似乎只要有足够的搅拌时间，搅拌釜内的液滴都应该具有相同的直径。实际上并不是如此。这是因为液体搅拌时，不仅存在大液滴的破碎过程，同时也存在小液滴相互碰撞而聚并的过程。破碎和聚并过程同时发生，必然导致液滴尺寸的不均匀分布，其中大液滴是由小液滴聚并而成，小液滴则是大液滴破碎的结果。实际的液滴尺寸分布决定于破碎和聚并过程之间的平衡。

此外，在搅拌釜内各处流体湍动程度不均也是造成液滴尺寸分布不均匀的主要因素。在叶片的区域内流体湍动程度较高，液滴破碎速率大于聚并速率，液滴尺寸较小；在远离叶片的区域内流体湍动程度较低，液滴聚并速率大于破碎速率，液滴尺寸变大。

在实际过程中，如果希望液滴尺寸分布宽一些，则应使流体在设备内的湍动程度分布不均，在某一区域造成对液滴破碎的有利条件，在另一区域造成对液滴聚并的有利条件。

如果希望液滴大小均一，可针对上述导致液滴分布不均匀的原因采取如下措施：尽量使流体在设备内的湍动程度分布均匀；在混合液中加入少量的保护胶或表面活性物质，使液滴在碰撞时难以聚并，许多高分子单体溶液的悬浮聚并过程，就是采用这种方法获得大小均匀的聚合物颗粒。

6.3.2　宏观流体与微观流体

人们习惯把具有不同停留时间的物料颗粒之间的混合称为返混，也有人将这种混合称为宏观混合。它用停留时间分布来表征。同时，还有另外一种混合，用于描述物料在反应器内流动时的聚集状态，这种混合又称为微观混合。

流动的物料根据其性质而形成某种特殊的聚集状态。此状态有两个极端，分别称为宏观流体和微观流体。所谓宏观流体，指流体中分子聚集成团块流体，这些流体粒子之间不发生任何物质交换，各个粒子都是孤立的、各不相干的，它们之间不会产生混合。这种状态又称为完全离析的状态。在实际流动中，不聚并的液滴、固体粒子及其非常稠的液体等均可看作是宏观流体。所谓微观流体，指流体中的分子不与邻近的分子附着而独立流动，此时物料粒

子之间所发生的混合是在分子尺度上进行的。如果反应器中完全不存在宏观流体时，称此状态为微观混合达到最大，或称最大微观混合。这说明这种微观混合有两种极端状况：一种是不存在微观混合，完全离析，相应流体称为宏观流体；另一种是完全不存在离析，达到最大微观混合，相应的流体称为微观流体。介于上述两者之间的称为部分离析或不完全微观混合，即两者并存于体系之中。

对于多相体系，固相物料均表现为宏观流体，而气体与液体则根据其接触方式可以是宏观流体，也可以是微观流体。在喷射反应器中，液滴分散在气体中，则气体为微观流体而液体为宏观流体。

对于某一反应体系，介于宏观流体和微观流体之间，混合作用的影响取决于反应特征时间 t_r 与流体中邻近微元体相互混合的特征时间 t_m 之比值。当反应速率较慢时，即 t_r 远大于 t_m，则按微观流体处理可以达到较好的近似；当反应速率非常快时，即 t_r 远小于 t_m，则处理比较复杂。

对于宏观流体，由于流体粒子之间不存在任何形式的物质交换，流体粒子就像一个有边界的个体，从反应器的进口向出口运动，也就像一个小间歇反应器一样进行反应，其反应程度取决于该粒子在反应器内的停留时间。

假定进口流体中底物浓度为 c_{S_0}，当反应时间为 t 时，其浓度为 $c_S(t)$。根据停留时间分布可知，停留时间在 $t \sim t+dt$ 间的流体粒子所占的分布为 $E(t)$ dt，则该部分流体对反应器出口流体中底物的浓度 c_S 的贡献应为 $c_S(t)$ $E(t)$ dt，将所有这些粒子的贡献相加，即得到反应器出口处底物的平均浓度 c_S，即：

$$c_S = \int_0^{\infty} c_S(t)E(t)\mathrm{d}t \tag{6-40}$$

这里用 c_S 表示底物出口浓度的平均值，是由于不同停留时间的流体粒子其出口 $c_S(t)$ 值是不同的，而反应器出口浓度实质上是一平均值。式中 $c_S(t)$ 是底物浓度随时间 t 变化的关系式，即为动力学方程式，也就是底物在间歇操作的反应器内所表现的动力学行为。因此，只要知道反应的动力学方程和其停留时间分布，便可预测反应的结果。这也是一种描述非理想流动的模型，称为停留时间分布模型。若以底物转化率表示可写为

$$c_{XS} = \int_0^{\infty} c_{XS}(t)E(t)\mathrm{d}t \tag{6-41}$$

混合状态的不同，将对反应产生不同的影响。设浓度分别为 c_{S_1} 和 c_{S_2} 而体积相等的两个流体粒子，在其中进行 n 级不可逆反应。如果这两个粒子是完全离析的，则其各自的反应速率应为 $r_{S_1}=k_r c_{S_1}{}^n$ 及 $r_{S_2}=k_r c_{S_2}{}^n$，其平均反应速率则为

$$r_S = \frac{r_{S_1}+r_{S_2}}{2} = \frac{k_r(c_{S_1}^n + c_{S_2}^n)}{2} \tag{6-42}$$

假设这两个粒子之间存在微观混合，且混合程度达到最大，则混合后的底物浓度为 $(c_{S_1}+c_{S_2})/2$，此时平均反应速率应为

$$r_S' = k_r[(c_{S_1}^n + c_{S_2}^n)/2]^n \tag{6-43}$$

这说明了微观混合程度不同将会对化学反应的速率产生影响，完全离析时的平均反应速率为 r_S，而微观混合为最大时则为 r_S'，两者孰大，与 n 值有关。对于一级反应，显然 $r_S = r_S'$。若 $n>1$，r_S 与 c_S 的关系曲线为凹曲线，$n<1$ 时则为凸曲线（图 6-21）。当 $n>1$ 时，完全微观混合下平均反应速率 r_S'为 B 点的纵坐标值，而完全离析时的平均反应速率为 D 点的

纵坐标值。因此，当 $n>1$ 时，$r_S > r_S'$，即由于微观混合的存在而使平均反应速率下降。当 $n<1$ 时，同样进行分析可知 $r_S < r_S'$，即微观混合的存在使平均反应速率加快。生物反应基本上都属于 $n<1$ 的反应，微观混合的存在显然是有利的。

上面讨论的是流体混合状况对反应速率的影响。现在再考察流体混合对反应器工作状况的影响。对间歇操作的反应器，在任何时刻下，反应器中所有流体粒子均具有相同的停留时间，组成亦相同，因此微观混合的程度不应影响反应器的工况。对于平推流反应器，因为同一截面上所有流体粒子的停留时间相同，组成自然也相同，所以微观混合程度对平推流反应器工况也不产生影响。全混流反应器则与上述两种反应器有很大的不同，由于流体粒子的停留时间不同，其组成也不同，除一级反应以外，微观混合的程度将影响反应器的工况，这种影响随着停留时间分布的不同而不同，返混程度越严重，微观混合程度的影响越大。图 6-22 显示不同反应级数时，全混流反应器中混合程度对达到一定转化率所需反应器体积的影响。

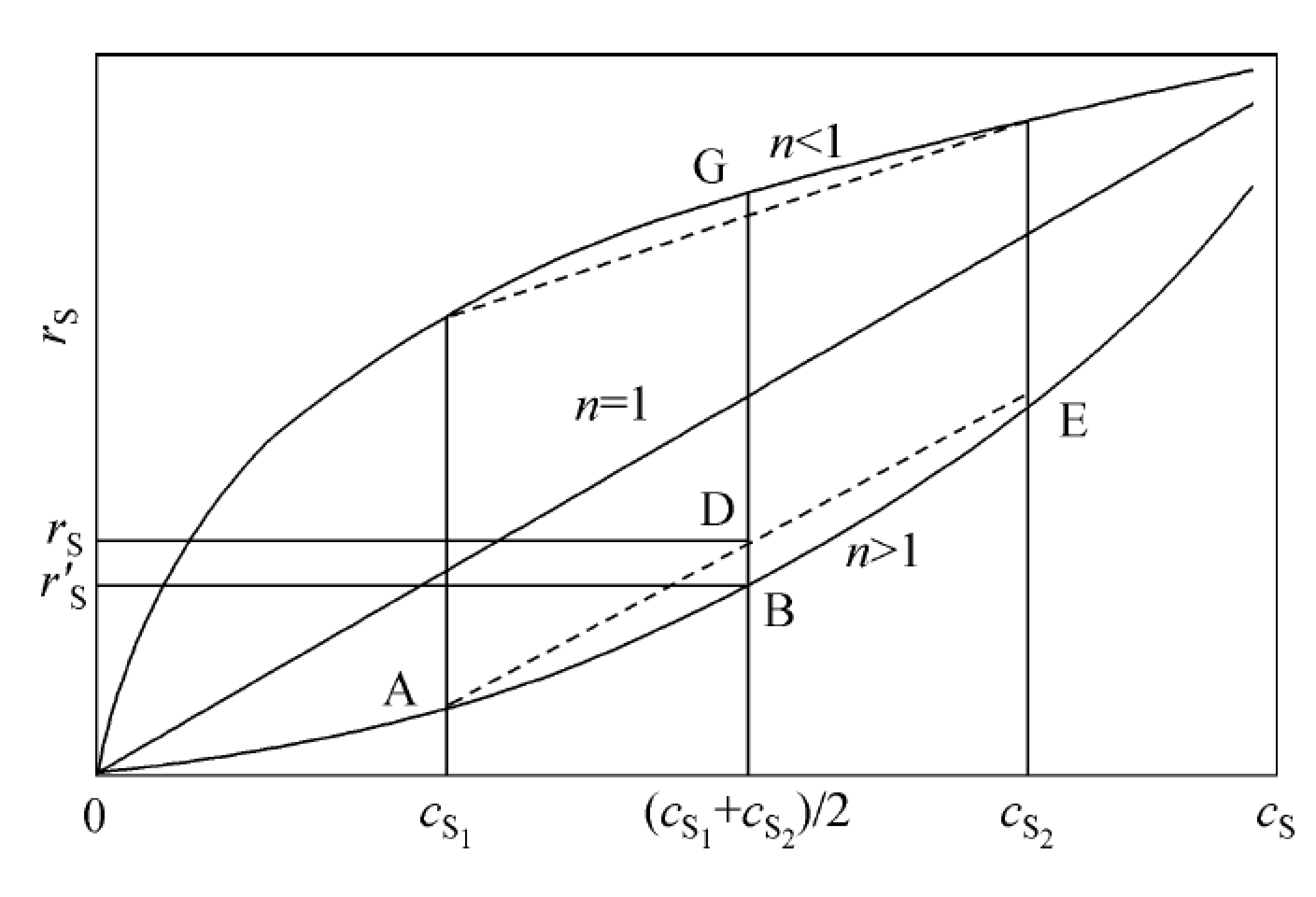


图 6-21　流体混合对反应速率的影响

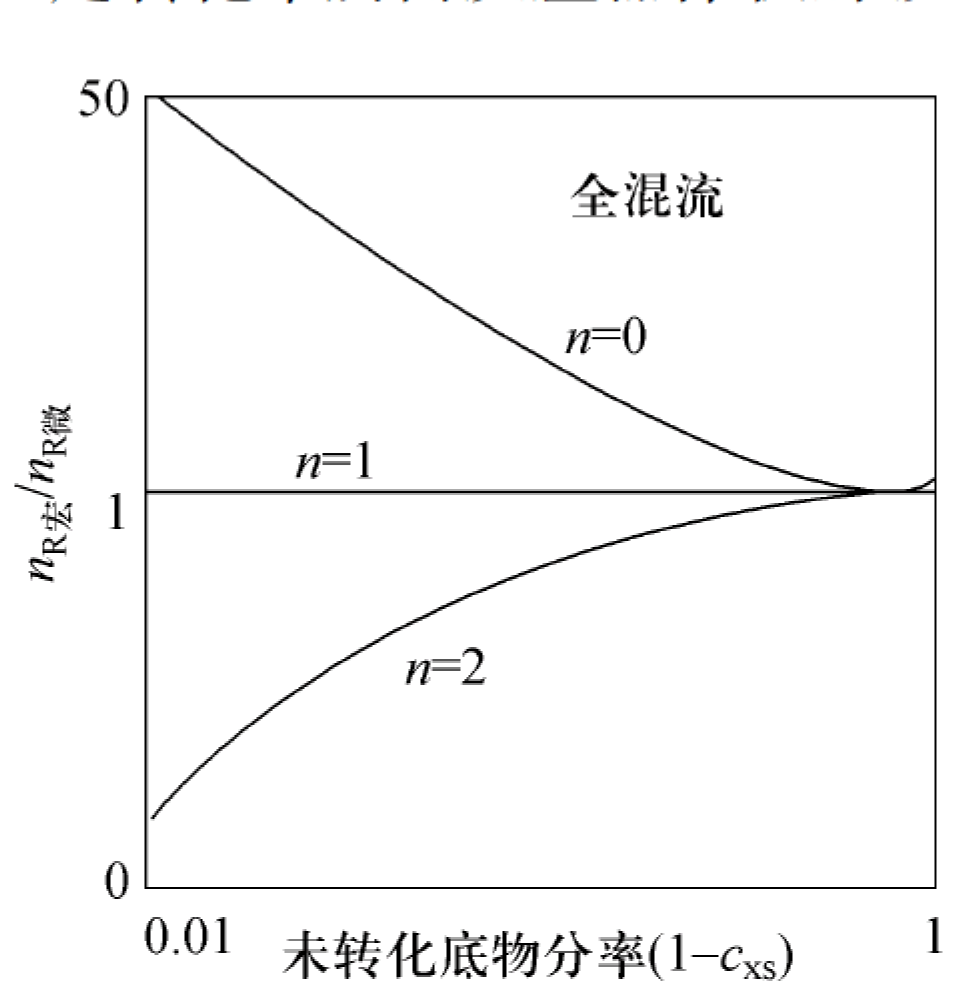


图 6-22　CSTR 中混合程度对不同动力学的影响

6.3.3　生物反应器中混合时间的测定

混合时间的测定有许多种方法，多数要加入某种示踪剂。示踪剂必须具有与反应器中液体相似的物理性质，比如黏度和相对密度要相同，混合热要小，加入的示踪剂的体积不大。示踪剂不应与培养液发生相互作用，无毒，不会引起相变化，没有抗泡沫性质。示踪剂不能很快消失，如挥发至气相或吸附到微生物上。检测器不应干扰测定系统。在小型装置中，电极不应干扰流场，在大型发酵罐上，要装有传感器和取样口。

1. 电导法　这种方法是加入电解质示踪剂，用电导仪测定其响应。在小型装置上，这种方法被广泛采用。它的优点是方法简便，响应很快。在大型发酵罐上，所需的电解质量太大（对 $100m^3$ 罐需 100～500L 电解质），这种方法不宜采用。发酵罐中的气泡会干扰测定电极。另外，加入电解质，提高了渗透压，改变了培养液的流变学性质，也改变了生长条件。

2. 加热法　这种方法是加入一定体积的加热液体，用热电偶测定响应。这种方法很少使用，即使使用也仅局限于小型冷模实验。

3. pH 法　这种方法是加入酸或碱，用一个或几个 pH 电极测定响应。要注意的是不能简单地使用滴定曲线，因为它是非线性的，必须把信号转换成酸或碱的浓度曲线。为此可选择一个固定的调节范围，即仔细调 pH 到一个确定的值，加入一定量的酸。

选择调节范围的另一考虑因素是 CO_2 和碳酸的平衡。CO_2 变成碳酸的反应很快，反之

则较慢。因而对于混合时间的测定，只能用加酸的方法。

尽管复杂，pH 法常用于大规模发酵罐的混合时间测定。电极响应快，可灭菌，罐上常已配备 pH 电极。并且常配置加酸或碱的管路。

4. 放射示踪法 这种方法是加入示踪剂，取样测定混合，也可从流出管测定，检测器放在管外即可。如果安全问题能解决，这种方法有许多优点：所需示踪剂很少，低浓度下仍很精确，易于无菌操作，取样少，可在线测定。最大缺点是安全问题。这种方法在大型反应器的混合测定中很有意义。

5. 染色或脱色法 这种方法是加入染色或脱色剂（如甲基蓝）。示踪剂的分散可以用眼观察，用透明度或样品的比色测定。脱色可以是指示剂随 pH 的颜色变化，如溴酚蓝或酚酞。脱色法在寻找静止区方面特别有用。

此法在大型反应器上使用存在问题，在小规模的发酵液的试验中也受到限制。许多示踪剂会吸附到发酵液中的颗粒上，一些试验是不可逆的，从而产生大量带色的废液。大型罐是不透明的，发酵液也常不透明，不得不大量取样。总之，这种方法不适用于大型反应器。

6. 流动跟踪法 该方法是加入一个中等浮力的流动跟踪子，里面装有无线电发射器。这个跟踪子每次通过叶轮区都被围绕叶轮的环形天线记录下来。这种方法看起来很有意义，但在大规模应用或无菌条件下应用都受到限制。更大的问题是在气液分散系统中，持气量不同，“中等浮力”难以确定。

7. 化学反应法 前面讲的所有方法测的都是宏观混合，测定的混合尺度是电极的尺度或取样的尺度，一般为 1 ~ 10mm。在生物反应上，这种尺度的混合已能满足要求。但对快速化学反应，分子尺度的微观混合很重要。

对于小规模模拟系统，有许多方法可以采用，其中电导法用得最多。对单相系统，电导法经济可靠。对发酵液，特别是大规模发酵罐中的发酵液，推荐用 pH 法或放射示踪法。测定的混合尺度由电极或取样的大小所决定，限于宏观混合的尺度。所有测定方法的优、缺点比较列于表 6-4。

表 6-4 混合时间测定方法的优、缺点

	小规模系统（$<1m^3$）			大规模系统（$>10m^3$）		
	液体（冷模）	气－液（冷模）	气－液－生物（发酵）	液体（冷模）	气－液（冷模）	气－液－生物（发酵）
电导	+	±	−	+	−	−
加热	±	±	−	−	−	−
pH 值	±	±	+	±	±	+
放射	+	+	+	+	+	+
染色/脱色	+	±	±	±	±	±
流动跟踪	+	±	±	+	±	±
化学反应	+	±	−	+	±	−

6.3.4 体系均一性对生物反应的影响

对于非一级反应系统，产率是系统混合程度的函数。混合程度本身是由机械混合决定的，分为宏观混合和微观混合。酿酒酵母的连续培养中，微观混合引起了混合程度的下降，

产生了代谢抑制现象。

一个反应系统要能反映混合敏感度需具备两个条件：第一是反应系统中的反应物呈不均匀分布，但具有确切的混合程度，混合程度影响这种分布；第二是反应为非一级反应，流体元的停留时间符合下列条件。

$$\int_0^t r(c_S)\,dt \neq tr(\overline{c_S}) \tag{6-44}$$

为了评估生物系统对不同混合程度的响应，另一个附加的要求是典型的反应时间不能比在非均匀区停留的总时间长很多。

在通气微生物培养过程中，微观混合指细胞规模的混合，宏观混合指与反应器几何尺寸相当的混合。氧浓度达到宏观混合均匀的动力来自于流体压力或空气分布器的非理想传递。这种氧浓度的不均匀性造成代谢活性的不均匀及整个反应器中细胞代谢途径的生物学响应。从微观混合的角度去考察氧，气泡附近区域氧浓度的变化构成膜传质理论的基础。实验考察生物反应器中微观混合的生物学响应的研究工作比较困难。

从宏观混合的角度去考察液体状态的营养物质，即使在混合很好的系统中，可以假设在进料区域存在较高浓度的营养物质。实验结果表明，这种浓度的提高虽然有限，但这种宏观尺度的营养物质的不均匀有可能产生生物学响应。

甲醇加入位置的不同会改变甲醇营养菌的呼吸商，而加入位置的变化对均匀度的影响尚不能确定，短暂的较高甲醇浓度的生理效应也不清楚。在单细胞蛋白生产系统中，局部区域较高的甲醇浓度不利于菌体的生长。在糖类连续发酵系统中，混合模式改变了洗出的临界稀释率，这是因为混合程度改变了糖类的浓度，或者是絮凝物的选择性去除，或者是絮凝物大小的改变影响了氧的利用。进料区液体营养物质的 pH 值对酿酒酵母培养过程中酶活力也有重要影响。

证明混合敏感性的最好方法是考察限制区域的低生长速率。在葡萄糖限制、定态、低稀释率的酿酒酵母的培养过程中，使用能够减少示踪物混合时间的营养物质注射口，能够提高细胞产率。这是因为改善混合、减小营养限制区域，使更多的营养贫乏区的细胞接触到足够的葡萄糖以维持生存。

混合敏感度的反应应当是非一级反应。Monod 的半经验动力学模型可以应用于大多数生物系统。当底物浓度超过一定值时，生长过程变成了底物浓度的零级反应；在很高的浓度（相应地有较高的稀释率）下，由于底物代谢抑制形成非线性动力学，对生产的影响更大。

最后考察的是细胞是否对环境的迅速波动有响应。有的细胞能够短暂地忍受抑制或一定浓度的毒物而无相应的影响，有的细胞能作出迅速反应。据报道，每隔 20s 加入营养物质会降低细胞得率，生长过程在突然快速生长和饥饿状态之间转换。有步骤地改变葡萄糖的添加速率引起胞内 DNA 变化在一定时间达到一个新的定态，这个响应时间与反应器的混合时间相当。

6.4　剪切应力对生物反应的影响

6.4.1　剪切应力的概念

1. 剪切及其度量　剪切应力是单位面积流体上的切向力，剪切应力 τ 的单位为 $N \cdot m^{-2}$

或 Pa。对于牛顿型流体有：

$$\tau = \frac{F}{A} = \mu \frac{du}{dy} = \mu\gamma \tag{6-45}$$

式中：F 为切向力；A 为流体面积；μ 为流体黏度；γ 为剪切速率，或称剪切率或速度梯度（s^{-1}）。

$$\gamma = \frac{du}{dy} \tag{6-46}$$

式中：u 为流体速度；y 为切向距离。对于非牛顿型流体可用平均剪切速率代替剪切速率。

剪切是设计和放大生物反应器的重要参数。在生物过程中，严格地讲，对细胞的剪切作用仅指作用于细胞表面且与细胞表面平行的力，但由于发酵罐中水力学情况非常复杂，一般剪切应力指影响细胞的各种机械力的总称。

为表示生物反应器中的剪切应力，研究人员提出了很多度量方法，通常有如下几种：

（1）桨叶尖速率 $u_t = \pi ND_i$，其中 N 为搅拌桨转速，D_i 为桨直径。

（2）平均剪切速率 $\gamma_{av} = KN$，其中 K 为常数，其值因搅拌桨尺寸及流体性质而变，一般为 10～13。该式主要应用于层流及过渡流，但在湍流中也可成功应用。

（3）在动物细胞培养中，研究人员运用积分剪切因子 ISF 来定义剪切应力。

$$\mathrm{ISF} = \frac{2\pi ND_i}{D_R - D_i} \tag{6-47}$$

（4）为估算鼓泡塔中剪切应力，通过测量传热速率，发现剪切速率与表观气速成正比，即

$$\gamma = ku_G \tag{6-48}$$

该方程在鼓泡塔中被广泛引用。

（5）湍流旋涡长度。为促进传质与混合，一般反应器都在湍流下操作。湍流由大小不同的旋涡及能量状态构成，大旋涡之间通过内部作用产生小旋涡并向其传递能量，小旋涡之间又通过内部作用产生更小旋涡并向其传递能量，就这样能量逐级传递给小旋涡。湍流中流体－颗粒间相互作用，取决于旋涡及颗粒的相对大小。如果旋涡比颗粒大，颗粒将被旋涡夹带随旋涡一起运动，旋涡将不对颗粒造成影响。但当旋涡比颗粒小时，颗粒将受到旋涡剪切应力的作用。对于生物细胞而言，当旋涡比细胞小时，细胞可能受到剪切应力作用而损伤，当旋涡比细胞大时，细胞将随旋涡一起运动，不会受到剪切应力作用。旋涡大小可由 Kolmogorov 各向同性湍流理论计算。

Kolmogorov 理论认为，在足够高的雷诺准数下，湍流处于统计平衡状态，在各向同性下，旋涡长度 λ（eddy length 或 eddy microscale）可由下式计算：

$$\lambda = (\upsilon^3/\varepsilon)^{0.25} \tag{6-49}$$

式中：υ 为动力黏度；ε 为该处平均能量耗散速率，即单位质量流体消耗的功率。表 6-5 列出摇瓶及搅拌罐中能量耗散速率 ε 的计算。该理论被广泛接受，细胞损伤与湍流旋涡长度密切相关。表 6-6 为工业发酵罐中典型的湍流旋涡长度，其中发酵罐安装的是平叶桨，介质与水接近。

表 6-5　摇瓶及搅拌罐中能量消耗功率 ε 的计算

反应器	该点能量消耗功率（$W \cdot kg^{-1}$）	平均能量消耗功率（$W \cdot kg^{-1}$）	备　注
摇　　瓶	$\varepsilon = 1.09 \times 10^{-3} V_t^{-0.25} N^{2.81} \rho_L^{-1}$	$\varepsilon_{av} = 1.09 \times 10^{-3} V_t^{-0.25} N^{2.81} \rho_L^{-1}$	$\varepsilon = \varepsilon_{av}$
搅拌反应器	$\varepsilon_{max} = (\gamma_{max}/\gamma_{av})^2 \varepsilon_{av}$	$\varepsilon_{av} = 2\pi N M_S$	$\varepsilon \propto \gamma^2$

表 6-5 中 V_t 为反应器工作体积，M_S 为搅拌轴转动产生的扭矩。

表 6-6　工业发酵罐中典型的湍流旋涡长度（μm）

	小型罐（100L，$10kW \cdot m^{-3}$）	大型罐（1000L，$1kW \cdot m^{-3}$）
搅拌桨区	9	16
罐主体部分	24	43

2. 剪切应力的计算及测量

1）不同反应器中剪切应力的计算

（1）搅拌罐：用电化学法测出涡轮桨桨叶上最大剪切速率 γ。

$$\gamma / n = (1 + 5.3n)^{1/n} (N^{2-n} D_i^2 \rho / k)^{1/(1+n)} \tag{6-50}$$

式中：n 为流动指数；k 为连续系数；N 为转速；D_i 为涡轮桨直径；ρ 为流体密度。用同样方法测量出涡轮桨搅拌罐器壁上最大剪切速率为桨叶上最大剪切速率的 30%。

（2）气升式反应器：湍流强度、剪切速率或速度梯度都取决于能量耗散速率。在气升式反应器中，不同部位能量耗散不同，能量耗散速率被用来研究升液管、降液管及气升式反应器底部的剪切速率。

气升式反应器底部能量耗散速率为

$$E_B = 0.5\rho_L [u_{LD}^3 K_B A_D (1 - \varepsilon_{GD} - \varepsilon_{SD})]$$

$$K_B = 11.40 (A_D/A_B) 0.79$$

$$\varepsilon_{SD} = W/\rho_S (1 - \varepsilon_{GD}) \tag{6-51}$$

式中：u_{LD}为降液管中液体线速度；A_D 为降液管交叉部分面积；ε_{GD}为降液管中气体体积分率；ε_{SD}为降液管中固体体积分率；W 为固体装填率（$kg \cdot m^{-3}$）；ρ_S 为固体密度。下标 R、D、B 分别代表升液管、降液管及气升式反应器底部。

升液管中能量耗散速率（E_R）为

$$E_R = E_{in} - \rho_L g h_D U_{LR} A_R (\varepsilon_{GR} + \varepsilon_{SR})$$

$$E_{in} = Q P_a \ln [1 + \rho_L (1 - \varepsilon_G) g h_D / P_a] \tag{6-52}$$

式中：E_{in}为反应器中能量输入功率（W）；P_a 为大气压；Q 为气体体积流速；h_D 为通气时液面高度。

$$h_D = \frac{h_L}{1 - \varepsilon_G}$$

$$\varepsilon_G = \frac{A_R \varepsilon_{GR} + A_D \varepsilon_{GD}}{A_R + A_D} \tag{6-53}$$

式中：h_L 为不通气体时液面高度；ε_G 为平均持气率。

式（6-52）中，U_{LR}为升液管中液体空速，即

$$U_{LR} = u_{LR} (1 - \varepsilon_{GR} - \varepsilon_{SR}) \tag{6-54}$$

式中：u_{LR}为升液管中液体线速度。降液管中能量耗散速率（E_D）为

$$E_D = \rho_L g h_D u_{LD} (1 - \varepsilon_{GD} - \varepsilon_{SD}) A_D (\varepsilon_{GD} + \varepsilon_{SD}) \tag{6-55}$$

气升式反应器中不同部位剪切应力为

$$\tau_i = \frac{E_i t_{ri}}{h_i V_i (a_i + a_{Si})}$$

其中：
$$a_i = \frac{6\varepsilon_{Gi}}{d_B}, \quad a_{Si} = \frac{6\varepsilon_{Gi}}{d_P} \tag{6-56}$$

式中：下标 i 代表升液管（R）、降液管（D）、底部（B）等区域；V_i 为 i 区的体积，t_{ri}为 i 处的水力停留时间；h_i 为 i 区的高度；a_i 为气体比表面积；d_B 为气泡直径；a_{Si}为比固－液界面积；d_p 为固体（如微载体或细胞）直径。

$$t_{rR} = \frac{h_R}{V_{LR}}(1 - \varepsilon_{GR} - \varepsilon_{SR}), \quad t_{rD} = \frac{h_D}{V_{LD}}(1 - \varepsilon_{GD} - \varepsilon_{SD}), \quad t_{rB} = \frac{V_B}{V_{LD}A_D}(1 - \varepsilon_{GD} - \varepsilon_{SD}) \tag{6-57}$$

各部位剪切速率 $\gamma_i = \tau_i/\mu$。

如果在气升式反应器中进行微载体培养，则微载体周围剪切速率为

$$\gamma = \Psi\left(\frac{\rho_L}{\mu}\right)^2 \frac{d_P^2 E_i}{\rho_L V_i} \tag{6-58}$$

式中，Ψ 为 0.74。

计算结果表明，气升式反应器中底部剪切应力最大，升液管中次之，降液管中最小。通气速率增大时，各处剪切速率增大。

对于微载体培养，微载体装填量增大时，剪切速率降低，但载体直径及密度对剪切速率无影响。

2）剪切应力及剪切速率的测量

在湍流状态下很难直接测量剪切应力及剪切速率。剪切应力的测量方法如下所述。

（1）电化学法：在桨叶及反应器壁上装上许多微电化学探头，在反应器内装电解质液体如 0.004mol · L^{-1} $K_4Fe(CN)_6$ 及 $K_3Fe(CN)_6$ 并加 0.05mol · L^{-1} K_2SO_4 水溶液，根据扩散限制状态下双膜传质理论可建立电流和剪切应力之间的关系。用这种方法可测出桨叶及反应器壁上的剪切速率。

（2）溶氧电极法：有文献报道了一种用溶氧电极法测剪切应力的方法。溶氧电极外液膜厚度随剪切应力大小而变化，液膜厚度可通过模型计算，因此可建立剪切应力、液膜厚度、溶氧电极电流输出之间的函数关系，以测定剪切应力大小。

（3）速度梯度法：根据剪切速率定义，$\gamma = du/dy$，可见只要测出流体中的速度分布状态，即可计算出剪切速率。由所测速度分布可计算剪切速率特征值为

$$\gamma = 2\left[\left(\frac{\partial U_R}{\partial R}\right)^2 + \left(\frac{\partial U_Z}{\partial Z}\right)^2 + \left(\frac{\partial U_R}{\partial R} + \frac{\partial U_Z}{\partial Z}\right)^2\right]^{0.5} \tag{6-59}$$

采用幂律模型，表观黏度

$$\mu = m\gamma^{n-1} \tag{6-60}$$

式中，m 为黏度系数，n 为流动系数。

流场中速度的测量可采用激光多普勒测速仪（LDA），或者图像成形法等。

6.4.2　剪切作用对生物过程的影响

1. 剪切应力对微生物的影响

1）细菌：一般认为，细菌对剪切是不敏感的。细菌大小一般为 1 ~ 2μm，这比发酵罐中常见的湍流旋涡长度要小。另外，细菌具有坚硬的细胞壁，受剪切应力影响较小。

但也有细菌受剪切应力影响的报道。如在同心圆中受剪切的大肠杆菌细胞长度会增加。由于搅拌的剪切作用，曾观察到细胞体积的变化。

用大肠杆菌生产抗菌多肽小菌素 B17，在摇瓶培养时，B17 在胞内积累；但在 HARV 反应器（high-aspect rotating vessels）中，B17 分泌到胞外。研究结果表明，产生这种变化的原因是 HARV 中的低剪切作用。在 HARV 中，即使只添加一个玻璃珠就可以产生足够的剪切应力，使 B17 积累在胞内而不分泌到胞外。

在细菌发酵生产黏多糖（如黄原胶）时，由于胞外多糖的积累，培养液的黏度逐渐增加，从而造成供氧及混合困难。另在细胞外会逐渐形成一个黏液层，从而造成细胞内、外物质交换的障碍，使多糖产量下降。为提高多糖产量，反应器中的滞留层及细胞外的黏液层必须通过高剪切应力作用除去。如在一种新型细菌多糖 Methylan 生产中，当剪切应力逐渐增加到 30Pa 时，Methylan 产量增加。剪切应力继续增加时，产量稳定。这就说明了细胞外多糖层造成的传质限制减少了 Methylan 的生产。

2）酵母：酵母比细菌大，一般为 5μm，但比常见的湍流旋涡长度仍要小。酵母细胞壁较厚，具有一定剪切抗性，但是酵母通过出芽繁殖或裂殖会产生疤点。出芽点及疤点是细胞壁的弱处。有报道证明酵母出芽繁殖受到机械搅拌的影响。

3）丝状微生物：包括霉菌和放线菌，在工业上特别是抗生素生产中应用广泛。霉菌是一种丝状真菌，属真核生物，包括毛霉、根霉、曲霉、青霉等。放线菌属原核生物，包括链霉菌、诺卡菌、小单孢菌等。霉菌和放线菌都形成分支状菌丝，菌丝可长达几百个微米。

在深层培养中，丝状微生物可形成两种特别的颗粒，即自由丝状颗粒和球状颗粒。在自由丝状形式下，菌丝的缠绕导致发酵液的高黏度及假塑性。这样就导致发酵液中混合和传质（包括氧传递）非常困难。为增强混合和传质，需要强烈的搅拌，但高速搅拌产生的剪切应力会打断菌丝，造成机械损伤。如果菌丝形成球状，则发酵液中黏度较低，混合和传质比较容易，但菌球中心的菌可能因为供氧困难而缺氧死亡。

（1）球状形式：丝状微生物通过相互缠绕形成球状，菌球大小一般为 0.2 ~ 10mm，研究表明菌球大小取决于菌球形成及后续时期的搅拌强度。

丝状微生物形成菌球有两种类型。一种是共聚类型，在孢子萌发期形成，结果是菌球中含大量孢子。如曲霉每个菌球就含几百个孢子。对于这种类型，强烈的搅拌会阻止菌球的形成。另一种是非共聚类型，每个孢子形成一个菌球，菌球形成后，通过菌丝断裂繁殖又会形成新的菌球，从而孢子/菌球比率小于 1。对于这种类型，搅拌对菌球的影响尚不十分明确。

菌球一旦形成后会呈现出不同形态，依形态可分为疏松球状、中心紧密外围疏松球状和紧密光滑球状。紧密光滑球状可能会由于菌丝自溶而形成中心空洞。这些菌球会受到搅拌和培养条件的影响，一般当搅拌强度增加时，菌球变小而紧密，如图 6-23 所示。

搅拌会对菌球产生两种物理效果：一种是搅拌削去菌球外围的菌膜，减小粒径；另外一种是使菌球破碎。这些效果主要是由于湍流旋涡剪切引起的。另外菌球间碰撞及菌球与桨间碰撞也可能引起部分作用。

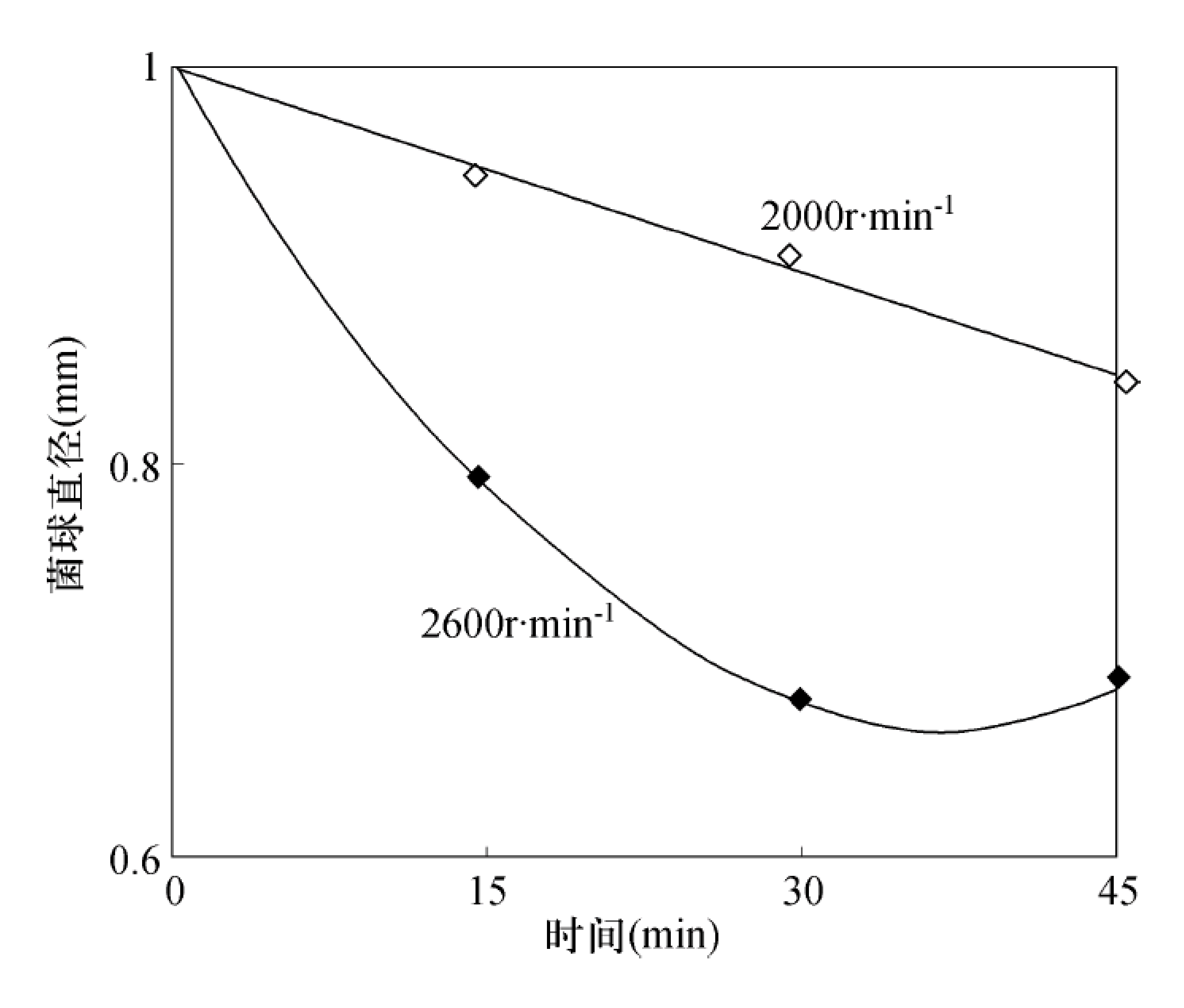


图 6-23　搅拌速度及时间对菌球直径的影响

（2）自由丝状形式：在搅拌罐中也常遇到自由丝状形式的菌丝体。由于剪切会打断菌丝，所以需要控制搅拌强度。搅拌强度会对菌丝形态、生长和产物生成造成影响，还可能导致胞内物质的释放。

机械力对自由丝状微生物的作用是打断菌丝，改变菌丝形态，可以通过显微镜观察到形态的变化。对青霉素发酵体系研究表明，搅拌转速增加会导致菌丝变短、变粗、菌丝分叉增多。红霉素生产过程中高速搅拌剪切使菌丝变短、变粗，但菌丝分叉减少。

有报道称，由于搅拌强度的增加，核苷酸等低分子质量物质会从真菌及链霉素中渗漏出来，但渗漏并不是细胞破裂引起的，且渗漏速率与培养条件及菌龄有关。

丝状微生物的生长和产物生产与搅拌密切相关。利用黑曲霉的 3 种突变株进行 11 批柠檬酸发酵表明，生物量及柠檬酸的生产均有一最佳搅拌转速。在低搅拌转速下产量低可能是由于低转速下氧传递的限制，高转速下菌体生长加快但产量下降是由于剪切使菌丝损伤造成的。形态观察表明，高转速下菌丝变粗，缠绕紧密，分叉增多。青霉素生产中发现，当桨叶尖速度大于 $4m \cdot s^{-1}$，青霉素生产比速率下降（表 6-7）。用同一菌株在 14L 及 150L 进行放大实验时发现相同结果，说明用桨叶尖速度对该菌株生产进行放大是一个很好的参数。

表 6-7　搅拌转速对青霉素发酵的影响

转速（$r \cdot min^{-1}$）	750	850	1000	1100
桨叶尖速率（$m \cdot s^{-1}$）	3. 14	3. 56	4. 19	4. 61
青霉素比生产速率（$u \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$）	8200	8200	6600	4000
细胞干重（$g \cdot L^{-1}$）	20	20	16	20

在剪切环境对产黄青霉菌发酵生产青霉素影响的研究中，发现产黄青霉结球程度和游离菌丝形态均与剪切环境有关。适当提高剪切水平可缩短菌丝长度并保证适度结球，从而降低发酵液黏度，对改善罐内混合和供氧有利。采用多层涡轮桨搅拌的生产罐中，剪切速率较高，青霉素的生产比速率也高。采用轴流型的水翼桨搅拌有利于强化混合和供氧，但造成剪切环境的变化，对青霉素发酵不利（图 6-24）。

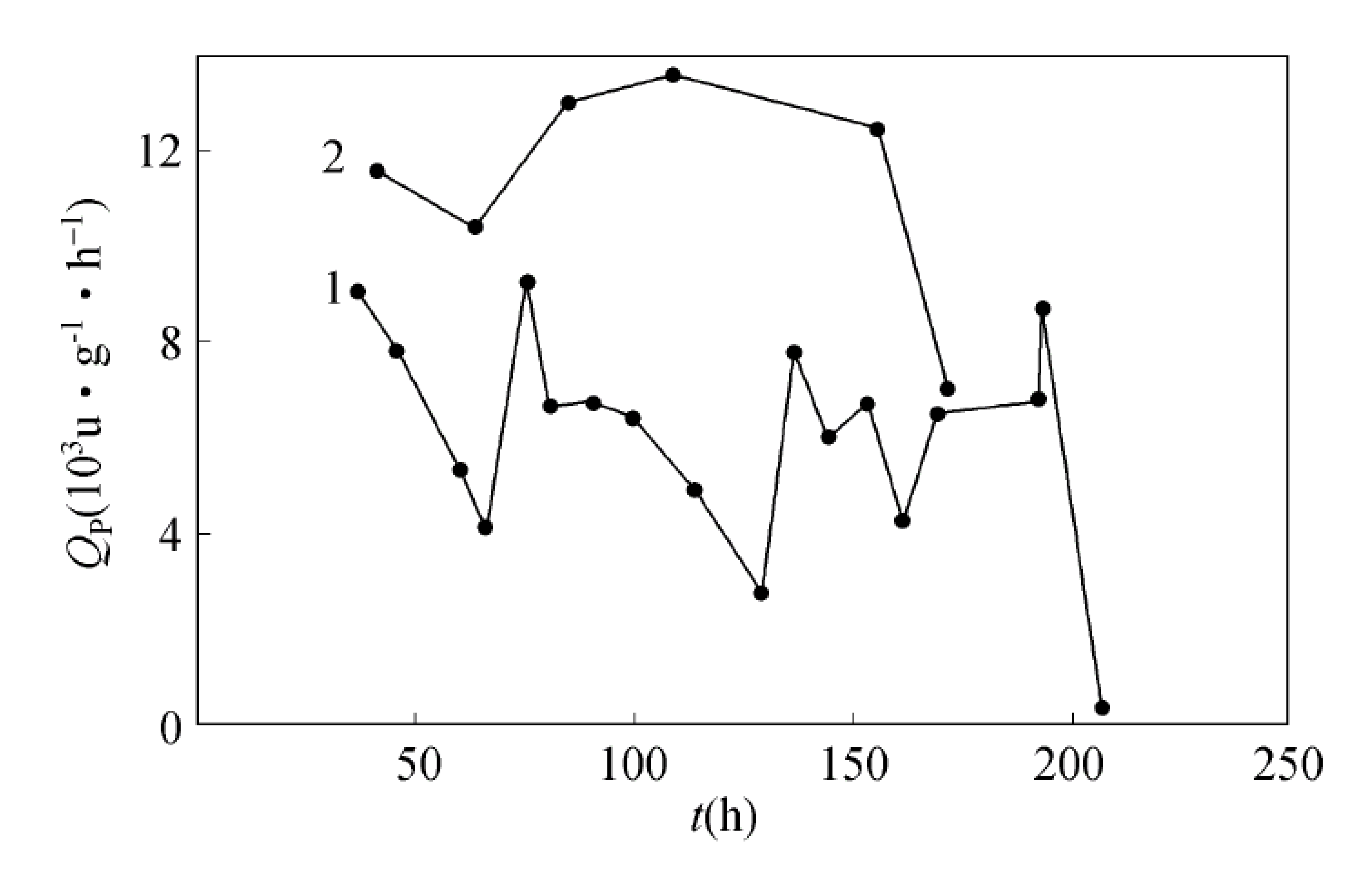


图 6-24　不同剪切环境下青霉素 G 合成比速率

1：轴流水翼桨；2：涡轮桨

有些真菌同一菌丝上的各个细胞间是没有隔膜的，各个细胞间的细胞质是连的，如黑根霉。研究发现无隔膜的霉菌对剪切破坏非常敏感，因为细胞壁的泄漏能使胞内物质完全丢失，导致细胞死亡。在体积为 137L 的发酵罐中，当搅拌速度由 $217r \cdot min^{-1}$增加到 $373r \cdot min^{-1}$时，最大生产比速率由 $0.339h^{-1}$下降到 $0.245h^{-1}$。

用链霉菌生产螺旋霉素时发现，在摇瓶中加入一个 3mm 玻璃珠，生物效价由 785 降到 455，加两个玻璃珠生物效价降为 0，在 2.5L 罐内转速为 $500r \cdot min^{-1}$时，生物效价为 890，转速为 $600 \sim 800r \cdot min^{-1}$时，效价为 0，说明该菌对剪切相当敏感。

但在用带棒链霉菌（*Streptomyces cavuligerus*）生产克拉维酸（clavulanic acid）时发现，在 5L 反应器中，搅拌转速从 $490r \cdot min^{-1}$（叶尖速度 $1.7m \cdot s^{-1}$）上升到 $1300r \cdot min^{-1}$（叶尖速度 $4.2m \cdot s^{-1}$），尽管菌丝断裂速率发生了变化，对产量却没有影响。这说明该菌菌丝形态与产量无关联，生产中可选对混合和传质有利的菌丝形态进行生产。

在红霉素生产中，转速对产量影响小于 5%。可能是由于高转速降低了高度缠绕的菌丝团百分率，对发酵有利；但同时高转速下形成了小尺寸菌丝，对发酵不利。两者综合的结果是转速对发酵影响不大。

从以上分析可知，剪切对丝状微生物的影响没有统一的结论，菌株不同，剪切的影响不同。

2. 剪切对动物细胞的影响　大规模的动物细胞培养应用越来越广泛，可生产许多有价值的药物如疫苗、激素、干扰素等。但是，动物细胞对剪切作用非常敏感。因为它们尺寸相对较大，一般为 10 ~ 100μm，并且没有坚固的细胞壁而只有一层脆弱的细胞膜。因此，剪切敏感成为动物细胞大规模培养的一个重要问题。

动物细胞按其贴壁性分为两类：一类是贴壁依赖性，这类动物细胞必须贴附在基质的表面才能生长；另一类是非贴壁依赖性，生长不需要贴附在基质表面，可像微生物一样悬浮培养。机械剪切对这两种类型的细胞的破坏机制是不同的，对于以微载体方式培养的贴壁依赖性细胞，剪切的破坏主要是由于小的湍流旋涡作用及载体间、载体与桨及反应器壁的碰撞造成的。对于在生物反应器中自由悬浮培养的非贴壁性细胞，剪切的破坏主要是由于气泡的破碎造成的。

1）贴壁依赖性动物细胞：早期采用转瓶分批培养，但是小的比表面积限制了大规模生产。微载体技术的发展克服了这一缺点。在搅拌状态下，微载体以悬浮形式存在，其比表面

积大，细胞和培养基容易分离，反应器易控制和放大。这种技术得到了广泛的应用。

微载体培养需要搅拌，使培养环境均一，传质充分，但搅拌不能过大，以免产生大的剪切应力损伤细胞。由于动物细胞培养对于氧要求较低，因此不使细胞沉降及均匀悬浮决定了对搅拌的要求。为了达到这些要求，实际的搅拌都是在湍流状态下进行。

通过典型的微载体特征分析微载体间及其与流体、反应器的相互作用表明，可能对细胞造成机械损伤的因素包括：①湍流旋涡与微载体间直接相互作用。一般反应器中 Kolmogorov 湍流旋涡长度为 120μm，而微载体直径为 150μm，湍流旋涡比载体小，会对载体上的细胞造成剪切损伤。②湍流状态下微载体之间的碰撞。如果微载体之间的距离与旋涡长度处于同一长度范围内，特别是载体直径也在该范围内时，这种碰撞造成对细胞的损伤。③载体与桨叶及反应器其他部位的碰撞。所有这些作用随搅拌的加强而使机械损伤变得严重。

通过对 Kolmogorov 湍流旋涡长度研究发现，它与相对生长程度关联良好（图 6-25）。实验中微载体直径为 185μm。当旋涡长度小于 100μm 时，剪切对细胞的损伤很大，细胞不能生长。当旋涡长度小于 150μm 时，细胞受到不同程度的剪切作用影响。可见，激烈搅拌形成的旋涡虽在客观上较大，但对微载体上的细胞的损伤已足够大。

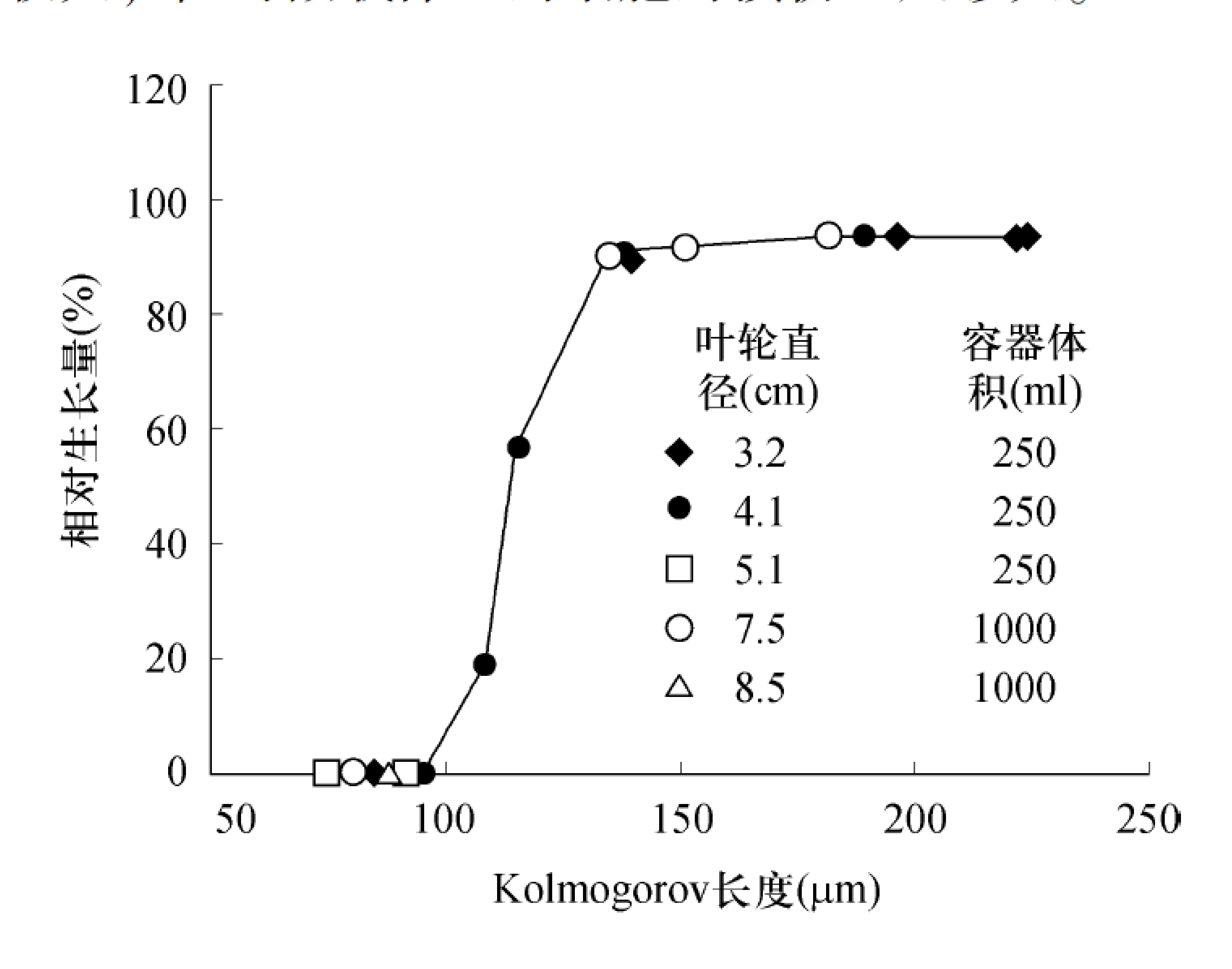


图 6-25　FS-4 细胞微载体培养中湍流长度对生长的影响

在稀释培养中发现，黏度增加会衰减湍流，减小水力学的损伤。但即使在黏度加倍的情况下，相对生长速率仍与 Kolmogorov 湍流旋涡长度关联良好，如图 6-26 所示。对于某一细

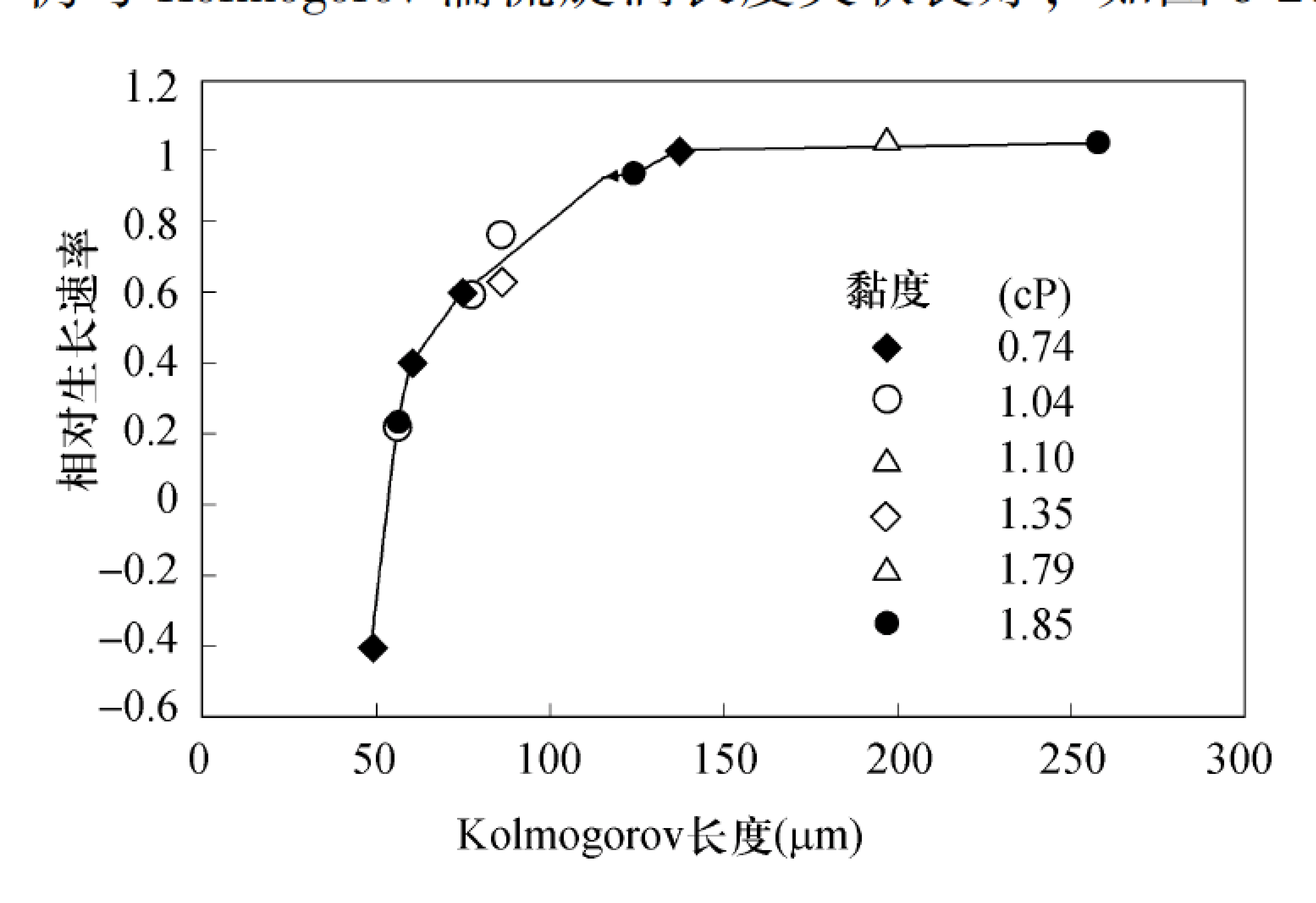


图 6-26　FS-4 细胞微载体培养中不同黏度下涡流长度对生长的影响

胞系，它在每个微载体上生长的最大细胞数是一个恒定值。为了增加细胞密度，就要相应增加微载体浓度，这使得微载体碰撞造成的剪切损伤越来越大。在 FS-4 细胞培养中，向反应器中添加与微载体物理性质接近的惰性球珠，在高速搅拌下，损伤呈现 2 种不同机制：一种是由于微载体间碰撞造成；另一种是由于湍流旋涡作用造成的。

2）悬浮细胞（非贴壁依赖细胞）：对于非贴壁依赖性动物细胞，其生长不必贴附在基质上，不能用与微载体培养相同的分析方法来考察剪切应力的影响。因为其个体比微载体要小得多，受剪切损伤的机制也不同，在一般细胞浓度下碰撞造成的损伤不大。

现已探明在悬浮细胞培养中，剪切对细胞的损伤主要是由于气泡破碎造成的。对于小规模的培养可采用表面曝气法避免气泡的损伤；对于大规模培养，表面曝气是行不通的。气体喷射是最简单、最经济的方法，研究表明，气泡对细胞的损伤取决于以下因素：细胞类型（有些细胞系对气泡相当敏感，有的敏感程度要低一些）、气泡大小（小气泡比大气泡的伤害作用大）、鼓泡频率（气体表观气速增加，细胞活性下降）。

细胞与气泡相互作用有 3 个作用区：喷嘴处气泡形成区、培养液中气泡上升区、培养液表面气泡破碎区。观察发现，最高的剪切和湍流区是在培养基悬浮液的表面上。气泡在该处由于表面张力小从而使气泡破碎，对细胞损伤最大。1992 年研究人员从培养液表面收集到一个气泡破碎样品，观察发现该样品中含大量细胞，其中 90% 已死亡。据报道单个气泡液膜上有 300 个细胞。1994 年报道大约 1050 个细胞被单个直径 3.5mm 的气泡破碎时杀死。在动物细胞悬浮培养中，只有当细胞被气泡吸附后才可能被气泡损伤，因此，细胞向气泡表面的吸附是细胞在生物反应器中死亡和损伤的控制步骤。

近年来提出了 3 个可能的机制来解释气液界面处细胞的死亡：①气泡快速破裂所引起的振动杀伤细胞，这种情况最典型的是在加消泡剂的情况下发生；②气泡周围液膜的物理剪切作用；③气泡中细胞的物理损伤。

在动物细胞培养中，加入较高浓度的血清可减少气泡对细胞的损伤，另外，加入表面活性剂也有较好的保护作用。关于它们的保护机制，目前仍有争议。一种解释是添加表面活性剂后形成 1 ~ 2mm 厚的稳定泡沫，细胞不能渗透到这种泡沫中，从而使细胞免受气泡破裂的影响。但也有人认为表面活性剂可吸附到气泡和细胞表面，从而阻止了细胞向气泡的聚集，减少了细胞的损伤。

在一种对剪切非常敏感的杂交瘤细胞 CRL 8018 培养中添加胎牛血清（FBS）发现，只有当 FBS 浓度大于 5% 时才有保护作用，并且这种保护作用马上产生效果。

气升式生物反应器中无机械搅拌，剪切应力相对低。气升式反应器中剪切对细胞的损伤主要是由于气泡破碎造成，但由于它的高/径比大（大到 9:1），可减少气泡破碎区。很多单克隆抗体在气升式反应器中即使在无血清的情况下也能培养成功。英国 Celltech 公司已成功地用 1000L 气升式反应器生产单克隆抗体。

3. 剪切对植物细胞的影响　植物细胞培养可用来生产一些高价值的植物细胞代谢产物，如奎宁、吗啡、紫杉醇等。植物细胞个体相对大一些，一般为 20 ~ 150μm，内含较大液泡，细胞壁较脆，无柔软性，这些特征表明植物细胞比动物细胞耐剪切能力稍好一些，但与微生物相比，对剪切作用仍很敏感，在高剪切环境下将损伤、死亡、解体。具体表现为细胞膜整体性的丧失，生长活性下降，有丝分裂活性降低，结团尺寸减小，形态发生变化，胞内物质如蛋白质丢失，生长和次级代谢产物生成速率发生变化。近来研究胡萝卜细胞表明，细胞的各种生理活性受到剪切水平的影响，如导致细胞分解及破坏膜完整性的能量要比阻止生长及

影响有丝分裂的能量高。

1）剪切对植物细胞结团大小的影响：植物细胞悬浮培养时一般会结团，结团大小为 40～2000μm 不等，受培养基组成、pH、激素等的影响，也因细胞种类而不同。环境条件如剪切应力、通气速率、细胞间碰撞等也影响结团大小。结团相对密度随培养时间变化很小，随细胞种类而不同，一般为 1.000～1.013。

在植物细胞培养中，控制结团大小是提高次级代谢物产量的关键因素，小的结团对次级代谢产物生产及氧和其他营养物的传质有利。在摇瓶培养前期应保持小尺寸结团，并在培养系统放大时维持同样大小。

已有人做了许多工作来减小植物细胞的结团，但控制及预测其大小仍很困难。了解影响结团的因素及建立它们之间的关联是非常重要的。

植物细胞培养一般在摇瓶或通气搅拌反应器或气升式反应器中进行，这些装置中流体一般都处于湍流状态，结团大小受到湍流旋涡长度的影响。

如果植物细胞生理特性和培养基组成都处于均一状态，外部影响即搅拌和通气速率将引起剪切应力及细胞间碰撞频率的变化，从而导致结团大小及细胞损伤的不同。为建立结团大小、旋涡长度、能量消耗之间的关系，作以下假设：①结团大小不受其在反应器内位置的影响；②相对结团之间及结团与反应器的碰撞，气泡破碎对结团大小的影响可忽略不计；③时间及渗透压的变化引起的细胞尺寸的变化对结团大小的影响可忽略不计；④生长动力学符合 Monod 方程。

如果结团大小 D_P 比湍流旋涡长度 λ 小，结团将生长变大。即当 $\lambda > D_P$ 时，有

$$\frac{dn}{dt} = \mu_n n \tag{6-61}$$

式中，n 为每个絮凝团内细胞数。如果结团比湍流旋涡长度 λ 大，结团将受到损伤，破碎的细胞数与结团内细胞数成正比。即 $\lambda \leq D_P$ 时：

$$\frac{dn}{dt} = \mu_n n - \beta n \tag{6-62}$$

式中，β 为结团受破坏的速率常数。

湍流旋涡长度可由 Kolmogorov 方程计算，即

$$\lambda = (\upsilon^3/\varepsilon)^{0.25}$$

假设结团内细胞数的比生长速率与细胞质量的比生长速率成正比，即

$$\mu_n = \mu_m/k_2 \tag{6-63}$$

β 与发生旋涡的频率成正比： $\beta = u'k$

$$u' = (\upsilon\varepsilon)^{0.25} \tag{6-64}$$

式中，k 为波数，u' 为湍流波动速度。

$E(k)$ 作为能量范围，桨雷诺准数的 $E(k)$ 为 1400～11000 时：

$$E(k) = k_3'P^2\upsilon^{-4}k^{-7} \tag{6-65}$$

式中，P 为该处能量消耗功率（W/kg）。

对于统计平衡的各向同性湍流，波数、能量消耗 P 及动力黏度 υ 可由下式关联：

$$k = k_3P^{0.25}\upsilon^{-0.75} \tag{6-66}$$

由式（6-64）～式（6-66）可得：

$$\beta = k_4P^{0.5}\upsilon^{-0.5} \tag{6-67}$$

有关摇瓶中及搅拌罐中能量消耗功率 P 的计算可由表 6-5 计算。

如果结团为球形，且结团内细胞平均直径为 d_P，则

$$\frac{\pi}{6}d_P^3 n = \frac{\pi}{6}D_P^3 \quad \text{或} \quad D_P = d_P n^{1/3} \tag{6-68}$$

以上模型可预测一定能量消耗功率下的结团尺寸大小。

2）剪切对植物细胞生长及代谢的影响：不同植物细胞对剪切耐受能力不同，如红豆杉（*Taxus cuspidata*）细胞对剪切相当敏感，可耐受最大平均剪切速率为 10.4s^{-1}，在培养紫苏细胞中，平均剪切速率达到 30s^{-1}时才能影响生长，而培养金鸡纳（*Cinchona robusta*）细胞，剪切速率为 64s^{-1}时仍生长良好。

不同生长时间的细胞对剪切的敏感度不同。在烟草细胞培养中，处于静止期的细胞比处于迟滞期或指数生长前期的细胞对剪切更敏感。在培养紫苏细胞时有类似于培养杂交瘤细胞的结果，可能是由于在静止期的细胞体积膨胀，细胞壁拉长而强度下降，对剪切更为敏感。

在同样剪切应力下，细胞在高浓度状态具有较高的成活率，在细胞浓度较低时，如在反应器操作的起初阶段，剪切应力应控制在低水平，以利于培养的进行。

剪切对次级代谢产物的生产也有影响。在仙鹤草细胞培养中，大的剪切应力会导致较低的细胞量和生物碱的产量。剪切影响烟草细胞的成活率，造成细胞自溶及酚类代谢产物的分泌。在红豆杉细胞生产紫杉醇（taxol）时，剪切应力增加，紫杉醇产量减少，比生长速率增加（图 6-27）。同时在大剪切应力下，细胞迟滞期缩短，指数生长时间段也缩短。

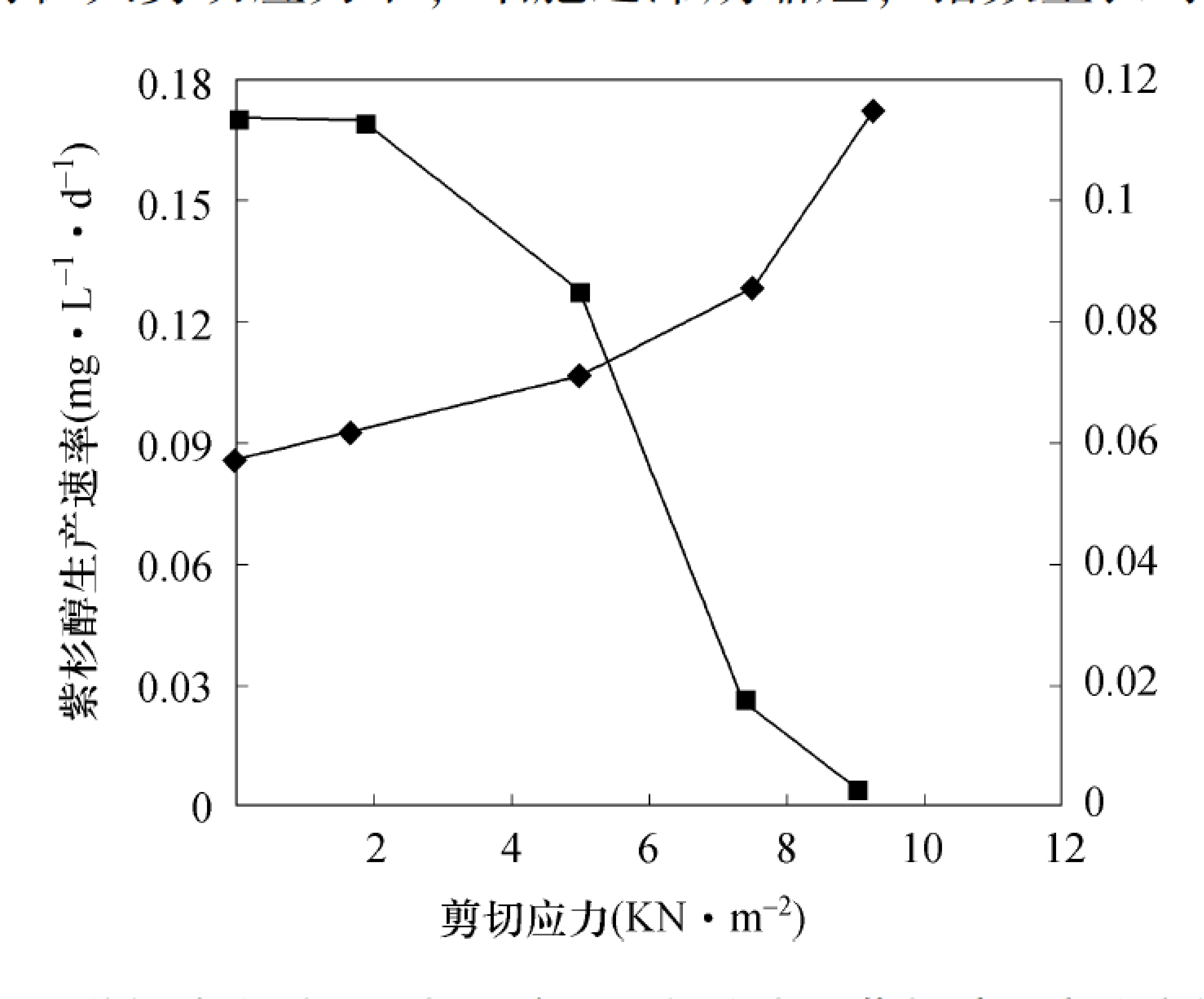


图 6-27　剪切应力对红豆杉细胞比生长速率及紫杉醇生产速率的影响

4. 剪切对酶反应的影响　剪切应力会在一定程度上破坏酶蛋白质分子精巧的空间结构，引起酶的部分失活。一般认为酶活力随剪切强度和时间的增加而减小。

在膜分离式酶反应器中，为减小超滤膜表面出现的浓差极化层和凝胶层对超滤速度的影响，提高反应室均匀混合程度，酶反应器采用不同类型的叶轮搅拌以求获得满意的混合及传质效果。在膜分离式的酶反应器中，葡萄糖淀粉酶失活随桨叶尖速度增大而加快。在同样搅拌剪切时间下，酶活力的丢失与桨叶尖速度是一种线性关系。在同样条件下，凹槽叶轮搅拌引起酶失活最大，刮力叶轮次之，平板叶轮搅拌引起的酶失活最小，这与搅拌造成的流体剪切程度相符。

6.4.3 低剪切反应器的设计

许多微生物，特别是丝状微生物及动物、植物细胞对剪切作用非常敏感，因此开发低剪切并且混合、传质效果好的反应器已成为反应器发展的方向之一。目前低剪切生物反应器的开发一方面是通过对传统反应器特别是搅拌反应器的改造；另一方面是开发全新的反应器。

1. 搅拌生物反应器中搅拌器的改型 尽管目前已开发出许多新型反应器，但由于搅拌生物反应器的灵活性、操作方式的多样性，特别是涉及高黏度非牛顿型发酵液，它更有独特的优点，因此它在生物技术实验室及整个发酵工业领域仍占据统治地位，这种情况在可预见的将来不会改变。

搅拌反应器中良好的搅拌器应该具有良好的固体悬浮能力、液体混合能力及气体分散能力。对剪切敏感的细胞，还要求搅拌产生的剪切温和。

从20世纪50年代至今，搅拌反应器中搅拌器绝大部分采用六叶圆盘涡轮桨，由于它分散气体能力较好，因此在早期发酵罐规模较小的情况下能扬长避短，盛行一时。它产生的流型为径向流，搅拌产生的剪切应力较大，特别是在桨附近。

随着发酵规模的扩大及各种新的发酵过程特别是动、植物细胞培养的发展，人们对涡轮桨缺点的认识越来越全面。随着流体力学研究的深入及对混合过程的理解，一些新型搅拌器不断出现，其中以轴向流式翼形搅拌桨为主。轴向流搅拌桨能量消耗低，轴向速度大，主体循环好，全罐混合好，剪切应力温和。具有代表性的轴向流搅拌桨有 Prochem Maxflo T 和 Lightnin A315（图6-28）。

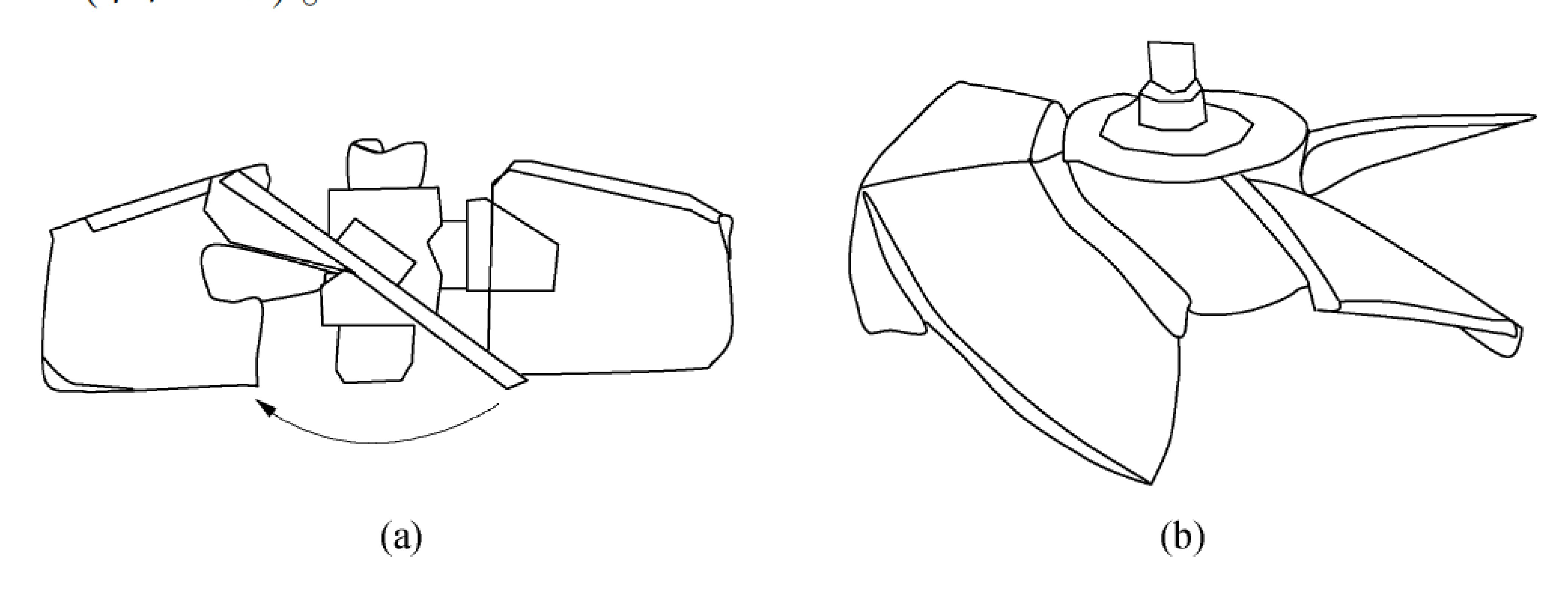


图6-28 两种典型的轴向流搅拌桨

（a）Lightnin A315 搅拌器；（b）Prochem Maxflo T 搅拌器

丝状真菌嗜食链孢菌（*Neurospora sitophila*）能将木质纤维素农作物秸秆转化成含蛋白质丰富的食品与饲料，但该菌对剪切应力比较敏感，在75L 涡轮搅拌桨发酵罐中发酵结果如表6-8所示。

如果用 Prochem Maxflo T 轴向流桨代替径向流的涡轮桨，则搅拌转速为250r·min^{-1}时，生长比速率为0.11，纤维素利用率为86%。即使在搅拌转速为400r·min^{-1}时对发酵仍无影响。

表6-8 搅拌转速对丝状真菌 *Neurospora sitophila* 发酵的影响

转速（r·min^{-1}）	μ（h^{-1}）	μR	粗蛋白（%）	纤维素利用素（%）
250	0.09	1.0	31.1	79.8
300	0.07	0.78	27.7	69.0
350	0.05	0.55	21.2	55.6

注：μ 为生长比速率，μR 为蛋白生产率

2. 新式非搅拌桨反应器的开发　反应器液面上的气泡破碎会产生很大的剪切应力，能杀伤细胞。为减少这种损伤，开发了一种新式的旋涡式反应器。通过产生、膨胀并传递旋涡，在层流下产生了很好的混合和传质，且能耗不增加。该反应器产生的剪切应力很低。

无泡式反应器的开发是另一热点，如管式微孔膜通气反应器。该反应器膜件采用硅橡胶管式膜，供氧及除去 CO_2 的渗透能力强，但缺点是泡点低，操作压力不能过高，且机械强度较低。该反应器已有商业产品供应。

过氧化碳携氧和 CO_2 能力强，是良好的氧载体。用聚醚乳化的饱和氧的过氧化碳液滴从反应器的顶部滴下直到底部。在该过程中完成供氧及去除 CO_2。这种供氧方式不产生气泡且无搅拌作用，剪切应力小。过氧化碳目前已商品化，且在抗生素生产中获得成功应用。

很多生物细胞及酶对剪切比较敏感，这一特点成为生物反应器研究开发的一大难点。目前对剪切作用的机制理解还不够，许多实验结果不能与流体力学理论联系起来。今后仍有必要加强剪切对生物细胞影响的基础研究，为生物反应器的设计、开发及操作提供依据。

实际发酵生产中的混合不只是液体的混合，表 6-9 列出了几种常见混合类型。

表 6-9　发酵生产中几种常见混合类型

类　型	说　明	应用实例
气 – 液	气、液接触混合	液相好氧发酵，如味精、抗生素等发酵
液 – 固	固相颗粒在液相中悬浮	固定化生物催化剂的应用、絮凝酵母生产酒精等
固 – 固	固相间混合	固态发酵生产前的拌料
液 – 液	互溶液体	发酵或提取操作
液 – 液	不互溶液体	双液相发酵与萃取过程
液体流动	传热	反应器中的换热器

6.5　气 – 液传质动力学与氧的传递

生物工业中的不同生产工段，都包含有物质传递过程。根据 Weisz 的观点：西勒准数为 1，且无任何扩散限制时，细胞和其他成分的生物催化反应以最大反应速率进行。但事实上是达不到的。

当反应器中存在多相时，反应速率不但与化学因素有关，而且与物理因素相关。质量传递过程是物理过程，它与化学因素交织在一起，极大地影响了实际反应速度。生物反应器中的质量传递过程主要为气 – 液传递和液 – 固传递。气 – 液传递主要是好氧发酵过程中的氧传递和 CO_2 释放；液 – 固传递主要发生在反应系统中含固定化酶、固定化细胞、生物膜、絮凝细胞的过程。在固态发酵中，还存在气 – 固传质和气 – 液 – 固三相传质。

反应系统中，反应物从反应液主体到生物催化剂表面的传递过程对生物反应过程影响很大，特别是基质的传质速率低于生物催化剂的反应速率时，生物催化剂的催化效率将受到基质传递速率的限制。因而，在一些发酵过程，如单细胞蛋白（SCP）和多糖发酵中，产物的生成速率可通过提高限制性基质的传递速率来加以改善。在大多发酵过程中，氧往往就是限制性基质之一。

氧是一种难溶气体，在 25℃ 和 1×10^6Pa 时，空气中的氧在纯水中的溶解度仅为 0.25mol·m^{-3}左右。由于培养基中含有大量有机物和无机盐，实际氧在液相中的溶解度就更低。当菌体浓度为 10^{15}个·m^{-3}，每个菌体体积（含水量 80%）为 $10^{-16}m^3$（直径 5.8μm），细胞呼吸

强度为 2.6×10^{-3}mol（氧）·kg^{-1}干细胞·s^{-1}，菌体密度为 $1000kg\cdot m^{-3}$，则每立方米培养基的需氧量为

$$2.6\times10^{-3}\times10^{-16}\times10^{15}\times1000\times(1-80\%)$$
$$=0.052\text{mol（氧）}\cdot m^{-3}\cdot s^{-1}=187.2\text{mol（氧）}\cdot m^{-3}\cdot h^{-1}$$

即在 $1m^3$ 培养基中每小时需要的氧是溶解量的 750 倍。因此，在生物反应过程中有效而经济地供氧是极为重要的。

6.5.1 气－液传质

生物反应中的气液传质包括好氧发酵中气相主体中的氧到液相主体的传递以及厌氧生物反应中甲烷和 CO_2 的排除等。大多数微生物发酵过程为好氧的，而且氧在水溶液中的溶解度很低，要维持发酵中正常的氧代谢，必须在过程中始终保持氧从气相到液相的传递。氧的传递在许多好氧发酵中是限制性步骤。因此下面以氧传递为例进行讨论。

假定对于好氧发酵，只有当氧进入细胞内部时，存在于液相的细胞才能利用氧。通入发酵液的气体形成气泡，气泡中的氧必须经历如图 6-29 中的途径才能被悬浮在液体中的微生物利用。

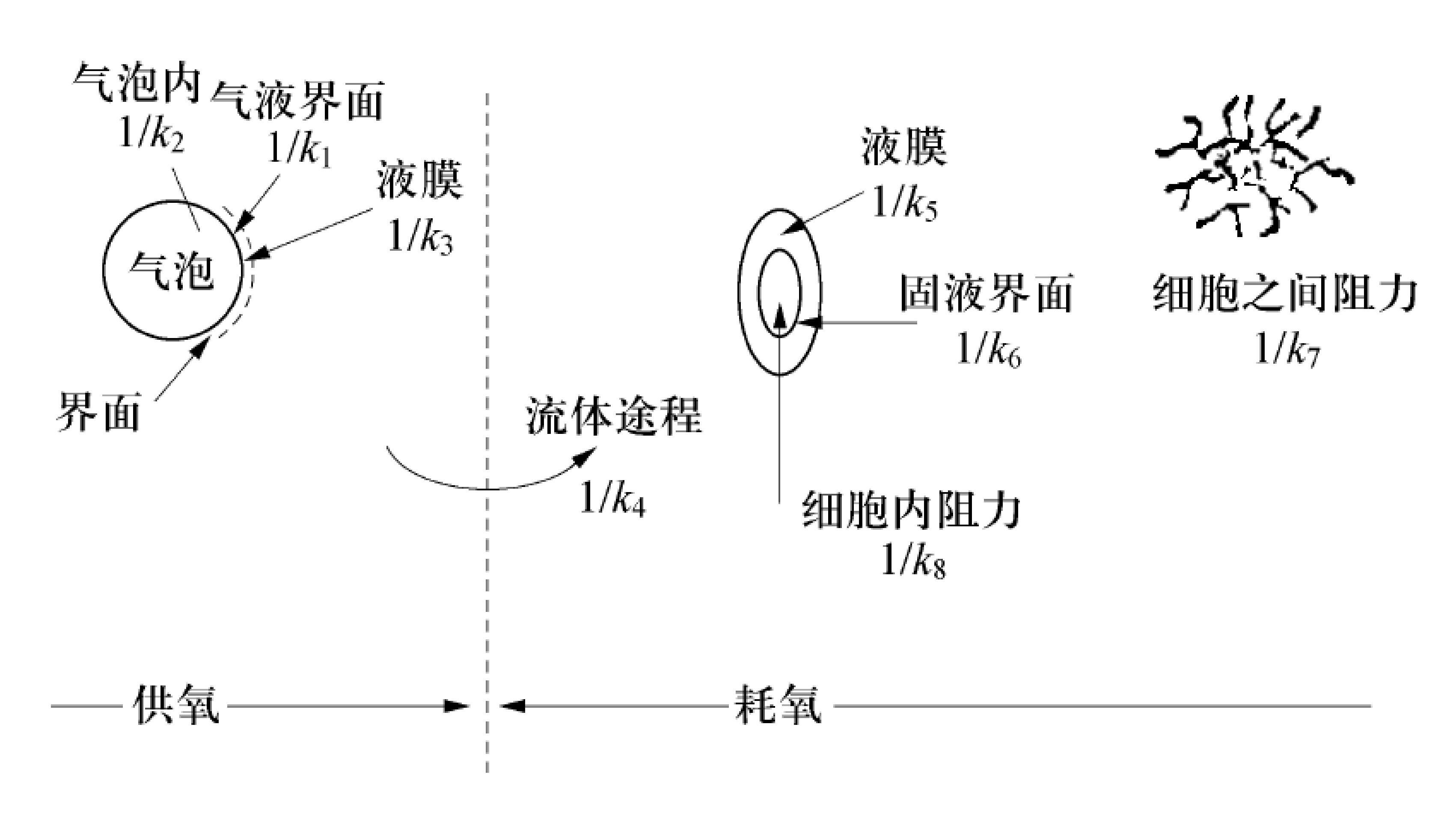


图 6-29　好氧发酵中氧的传递

氧从气相到微生物细胞内部的传递可分为 7 个步骤：①从气泡中的气相扩散，通过气膜到气液界面；②通过气液界面；③从气液界面扩散，通过气泡的液膜到液相主流；④液相溶氧的传递；⑤从液相主流扩散，通过包围细胞的液膜到达细胞表面；⑥氧通过细胞壁；⑦微生物细胞内氧的传递。

经过以上步骤后在细胞内部发生酶反应。通常③和⑤步的传递阻力是最大的，容易成为整个过程的控制步骤。

常见的描述氧传递的模型有 3 种。

（1）双膜理论：双膜理论认为，气、液两相间存在一个界面，界面两侧分别为呈层流状态的气膜和液膜；在气、液界面上两相浓度相互平衡，界面上不存在传递阻力；气、液两相的主流中不存在氧的浓度差。氧在两膜间的传递在稳定状态下进行，因此氧在气膜和液膜间的传递速率是相等的（图 6-30）。

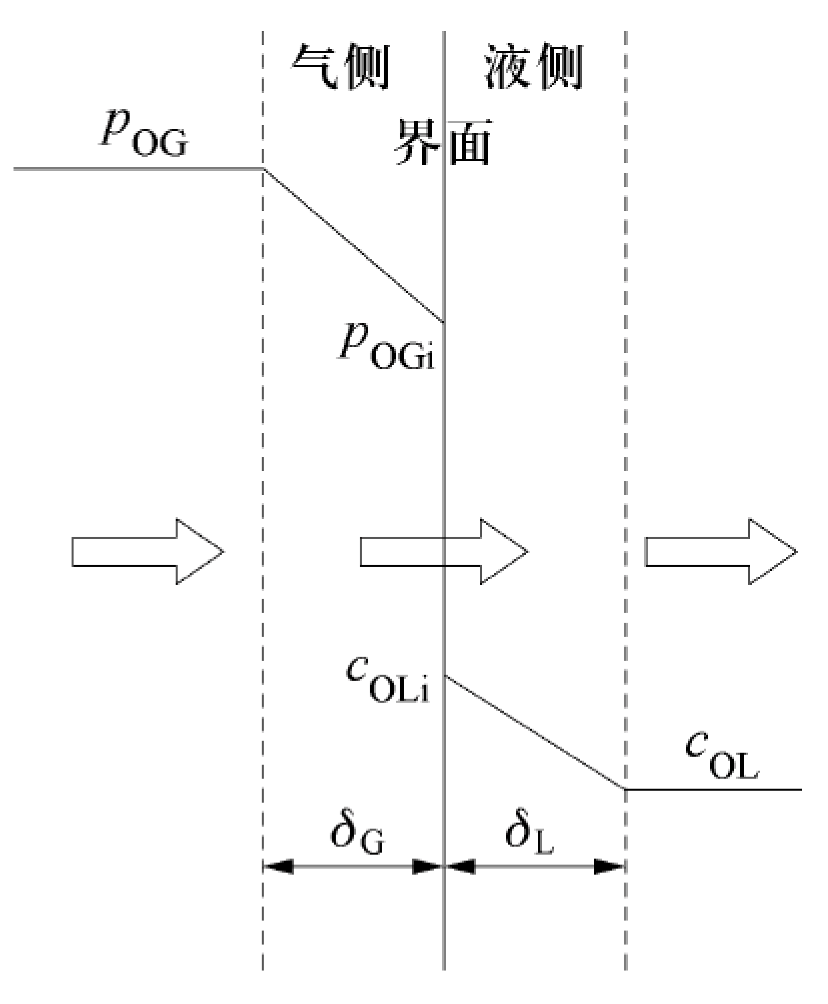


图 6-30　氧传递的双膜理论模型

（2）渗透扩散理论：渗透扩散理论对双膜理论进行了修正，认为层流或静止液体中气体的吸收是非定态过程，液膜内氧边扩散边被吸收，氧浓度分布随时间而变化。

（3）表面更新理论：表面更新理论又对渗透扩散理论进行了修正，认为液相各微元中气液接触的时间也是不等的，而液面上的各微元被其他微元置换的概率是相等的。

虽然后两种理论比双膜理论考虑得更为全面，从瞬间和微观的角度分析了传质的机制，但由于双膜理论较简单，所用的参数少，因此根据双膜理论发展起来的应用更为广泛。

下面以双膜理论为基础来讨论氧的传递。根据双膜理论，氧传递阻力来自气膜和液膜。

气膜侧的氧质量通量（N_G）为

$$N_G = q_G/A = k_G(p_{OG} - p_{OGi}) \tag{6-69}$$

式中：p_{OG} 和 p_{OGi} 分别为气膜侧的气相主体中的氧浓度和气液界面上的氧浓度；k_G 为气相传质系数；q_G 为气膜侧氧的总传递速率；A 为气液界面面积。

类似于气膜侧，液膜侧的氧质量通量（N_L）为

$$N_L = q_L/A = k_L(c_{OLi} - c_{OL}) \tag{6-70}$$

式中：k_L 为液相传质系数；c_{OLi} 和 c_{OL} 分别为液膜侧的气液界面氧浓度和液相主体中的氧浓度。定态下通过气膜和通过液膜的速率相同：

$$k_G(p_{OG} - p_{OGi}) = k_L(c_{OLi} - c_{OL}) \tag{6-71}$$

由于界面浓度不易测定，因此用液相参数关联的总传质系数 K_L 和总推力（$c_{OL}^* - c_{OL}$）表示 N_G 为：

$$N_G = N_L = k_L(c_{OLi} - c_{OL}) = k_L(c_{OL}^* - c_{OL}) \tag{6-72}$$

式中：c_{OL} 为液相主体浓度，可方便地测定；c_{OL}^* 为与气相分压相平衡的液相浓度，由 Henry 定律 $c_{OL}^* = Hp_{OG}$ 计算；H 为 Henry 常数；p_{OG} 为气相主体分压，也可测定。

根据式（6-72）可得到液相总传质系数 K_L 与液相传质系数 k_L 和气相传质系数 k_G 之间的关系：

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_G}\frac{c_{OL}^* - c_{OL}}{p_{OG}^* - p_{OGi}} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_G M} \tag{6-73}$$

式中，$M = \dfrac{1}{H} = \dfrac{p_{OG}^* - p_{OGi}}{c_{OL}^* - c_{OL}}$。对微溶气体，$M$ 远大于 1，因此：

$$K_L \approx k_L$$

几乎所有的阻力来自于液膜侧的质量传递。因此在描述气液传递时通常就用 k_L 代替 K_L。

6.5.2　摄氧率

单位体积发酵液的氧消耗速率称为摄氧率（oxygen uptake rate，OUR）。当过程受氧的限制时，可将氧视为限制性底物，遵循 Monod 方程，则摄氧率（OUR）为

$$\mathrm{OUR} = \frac{1}{Y_{X/O}} c_X \mu_m \frac{c_{OL}}{K_O + c_{OL}} \tag{6-74}$$

式中：$Y_{X/O}$ 为每消耗 1mol 氧所生成的细胞量；c_X 为细胞浓度；μ_m 为最大生长比速率；c_{OL} 为液相氧浓度；K_O 为氧的 Monod 常数。

单位发酵液体积内的氧传递速率为：

$$q = \frac{(\text{通量})(\text{界面面积})}{\text{发酵液体积}} = k_L(c_{OL}^* - c_{OL})\frac{A}{V_L} = k_La(c_{OL}^* - c_{OL}) \tag{6-75}$$

式中，$a = A/V_L$，a 为每单位体积液体的气液界面面积；整个反应器的平均氧传递速率（q_m）为

$$q_m = (1/V_L)\int q\mathrm{d}V_L \tag{6-76}$$

稳定状态时氧的传递速率与氧的消耗速率相等，因此：

$$k_La(c_{OL}^* - c_{OL}) = \frac{1}{Y_{X/O}}c_X\mu_m\frac{c_{OL}}{K_O + c_{OL}} \tag{6-77}$$

从上式可知，最大可能的传质速率为 $k_Lac_{OL}^*$，最大的摄氧率为（$1/Y_{X/O}$）$c_X\mu_m$。当 $k_Lac_{OL}^*$ 远远大于（$1/Y_{X/O}$）$c_X\mu_m$ 时，主要的限制来自于代谢，反应受生物速率限制。当 c_{OL} 趋于零时，反应受传质限制。

当氧传递为反应的限制性步骤时，比生长速率 μ 是 c_{OL} 函数。当 c_{OL} 大于临界氧浓度 $c_{OL,cri}$（约为 $3K_O$）时，生物的氧摄取速率受其他因素限制，μ 不再是溶氧的函数。

表 6-10 为 25℃下 9.8kPa 的氧溶于水中的平衡溶解度。当发酵液的性质接近于水的时候可用该表的数据获得 c_{OL}^*，但需注意表中所列的数据是用纯氧得到的，而实际发酵中通常用的是空气，根据 Henry 定律，c_{OL}^* 约为表中数据的 20%。

表 6-10　9.8kPa 下氧溶于水中的溶解度

温度（℃）	0	10	15	20	25	30	35	40
水中氧的溶解度（$\mathrm{mmol\cdot L^{-1}}$）	2.18	1.70	1.54	1.38	1.26	1.16	1.09	1.03

当连续稳定状态通气操作时，整个反应器的平均传氧率可由下式得到：

$$\mathrm{OUR}_m = (F_{in}p_{O_2,in} - F_{out}p_{O_2,out})/(V_LRT) \tag{6-78}$$

式中：F_{in}、F_{out} 分别为进入和离开反应器的空气的体积流量；$p_{O_2,in}$ 和 $p_{O_2,out}$ 分别为进入和离开反应器的氧分压；V_L 为发酵液气液混合体积；R 为气体常数；T 为绝对温度。

6.5.3　体积传质系数

体积体质系数（k_La）是两个参数的乘积，由于分别测定 k_L 和 a 的数据比较困难，实际测定中常将它们并为一项，称为体积传质系数，单位为 h^{-1}。影响 k_La 的因素很多，与反应器的结构、发酵液的理化性质、输入功率等都有关。归纳起来常见的 k_La 测定方法有 3 种。

1. 亚硫酸盐法　它是一种冷态测定法，通常用 CMC 或黄原胶模拟发酵液的物理性质，加入一定量的亚硫酸钠，利用亚硫酸钠在 Cu^{2+} 或 Co^{2+} 的催化下与氧发生快速反应的原理进行测定。反应如下：

（1）$2Na_2SO_3 + O_2 \xrightarrow{Cu^{2+},\ Co^{2+}} 2Na_2SO_4$

（2）$Na_2SO_3 + I_2 + H_2O \longrightarrow Na_2SO_4 + 2HI$

（3）$2Na_2SO_3 + I_2 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI$

当模拟介质中 Na_2SO_3 的浓度在 $0.018 \sim 0.45\mathrm{mol\cdot L^{-1}}$ 的范围内，温度为 20～45℃时，

式（1）的反应速率与 Na_2SO_3 的浓度无关，且远远大于氧的传递速率。液相中的溶氧浓度为零，氧传递为整个过程的控制步骤。因此用碘量法测定亚硫酸钠消耗的速率可求得氧传递速率 q。

$$q = k_L a c_{OL}^* \tag{6-79}$$

测定通常在发酵罐里进行，0.5mol·L^{-1}的亚硫酸钠至少需要加入 0.003mol·L^{-1}Cu^{2+}。从第一个鼓入的气泡开始计时，反应 4～20min，定时取样。将样品与过量的标准碘液混合，与氧反应剩余的亚硫酸钠全部与碘作用，反应如式（2）。剩余的标准碘浓液用标准硫代硫酸钠滴定，反应如式（3）所示。根据计量学由硫代硫酸钠的消耗量可计算出亚硫酸钠与氧反应的消耗量。

亚硫酸盐法具有一定的局限性，首先模拟溶液的物化性质不可能与实际发酵液完全相同，此外，该法要求较高的离子浓度，而高离子浓度会使界面面积和传质系数减少。但此法简便，在研究反应器的性能、放大和操作条件的影响时是很有用的。

2. 动态法　它是热态测定法，是依据氧的物料衡算进行的。对好氧间歇发酵，微生物生长旺盛时期，单位发酵液体积的氧衡算为

$$\frac{dc_{OL}}{dt} = k_L a(c_{OL}^* - c_{OL}) - r_{O_2} c_X \tag{6-80}$$

式中：r_{O_2} 为细胞呼吸速率［g（O_2）·g^{-1}（细胞）·h^{-1}］；c_{OL} 为溶氧（dissolved oxygen，DO）浓度；c_X 是细胞浓度；$r_{O_2}c_X$ 是摄氧率。在溶氧水平不再随时间发生变化后，突然停止供气和搅拌，DO 将随时间下降。此时的氧衡算式为

$$\frac{dc_{OL}}{dt} = -r_{O_2} c_X \tag{6-81}$$

DO 与时间 t 曲线的斜率即为摄氧率 OUR，即上式中的 $-r_{O_2}c_X$。然后再通入空气和搅拌，DO 将随时间 t 上升，此时的氧衡算为式（6-80），此时测定的 $\Delta c_{OL}/\Delta t$ 即为式（6-80）中 dc_{OL}/dt。将两个过程测定的值结合起来，可得线性关联式。

$$c_{OL} = c_{OL}^* - \frac{1}{k_L a}\left(\frac{dc_{OL}}{dt} + r_{O_2} c_X\right) \tag{6-82}$$

根据式（6-82）进行的测定是点值，由于试验误差及其他偶然因素，一个点的值不可靠，因此应在 $c_{OL} \sim t$ 曲线中取多组 $c_{OL} \sim \Delta c_{OL}/\Delta t$ 数据进行回归，Δt 的间隔越小越精确。对不同取样时间 i，将上式写成离散的形式为

$$c_{OL} = c_{OL}^* - \frac{1}{k_L a}\left(\frac{(\Delta c_{OL})_i}{(\Delta t)_i} + r_{O_2} c_X\right) \tag{6-83}$$

可得若干组 $c_{OLi} \sim (\Delta c_{OL})_i/(\Delta t)_i$ 数据，c_{OLi} 对 $\Delta\left(\frac{(\Delta c_{OL})_i}{(\Delta t)_i} + r_{O_2}c_X\right)$ 作图，回归得到的斜率为 $-1/k_L a$，Y 轴上的截距为 c_{OL}^*。

该法测得的值虽为实际发酵过程中的值，但还是具有一定的局限性。首先此法在 DO 低于微生物临界溶氧浓度时不能用，因为此时过程受传质限制，停止通氧时测得的摄氧率不为常数；其次测定摄氧率时用的式（6-81）是假定界面面积 a 为零的，实际上停止通气后，发酵液中的气泡并不会马上消失，也就是 $k_L a$ 不会马上变为零，因此 c_{OL} 对 t 的关系在开始可能不成直线。

有许多研究者采用冷态测定的方法，此时式（6-82）等式右边最后一项为零，试验

和数据处理比热态测定更加简单，不过实测值与发酵实际情况相差较大，因为模拟介质只能模拟发酵过程某一阶段的流体状况，而且发酵过程中产生的菌体和复杂的代谢产物对流体性质影响很大，难以模拟。但是冷态方法影响因素少，数据规律性强，仍是常用的研究方法。

3. 定态法　当发酵连续操作，且达到定态时，罐内菌浓度为常数，溶氧浓度 DO 也不随时间变化。此时可根据氧的物料衡算，直接测定 DO 的摄氧率 OUR，而得到 k_La。此时的物料衡算方程为

$$\mathrm{OUR_m} = k_La(c_{OL}^* - c_{OL}) \tag{6-84}$$

用式（6-78）对整个反应器作氧衡算。

用流量计测定连续发酵罐（即恒化器）的进、出口流量，用气相色谱分析进、出口气相中的氧，即可用式（6-84）算出 OUR，代入式（6-83）。用溶氧浓度电极在线检测 DO，就可用式（6-83）算出 k_La。

对小反应器，$(c_{OL}^* - c_{OL})$ 在器内的变化很小。大反应器的液层有一定的深度，底部和顶部的 $(c_{OL}^* - c_{OL})$ 差别较大，这时 $(c_{OL}^* - c_{OL})$ 应取顶部和底部 $(c_{OL}^* - c_{OL})$ 的对数平均值。

6.5.4　有关传质系数的关联

传质系数是物理性质和反应器几何条件的函数。由于多相混合流体力学的复杂性，根据纯理论基础得出有用的关系式几乎是不可能的。因此，通常由实验数据来得到经验关系式。关系式由无因次数群构成，可用于放大。

以下为气液传质系数关系式中常用到的无因次准数：

$$\text{Sherwood 准数}, \mathrm{Sh} = \frac{\text{总的质量传递}}{\text{扩散传递}} = \frac{k_L D_{32}}{D_{AB}} \tag{6-85}$$

$$\text{Schmidt 准数}, \mathrm{Sc} = \frac{\text{动量传递系数}}{\text{质量扩散系数}} = \frac{\mu_c}{\rho_C D_{AB}} \tag{6-86}$$

$$\text{Grashof 准数}, \mathrm{Gr} = \frac{\text{重力}}{\text{黏力}} = \frac{k_L D_{32}^3 \rho_C g \Delta\rho}{\mu c^2} \tag{6-87}$$

式中：D_{AB} 为 A 在组分 B 中的扩散系数；μ_c 为连续相黏度；ρ_C 为连续相密度；D_{32} 为 Sauter 平均直径。由下式计算：

$$D_{32} = \sum_{i=1}^{n} n_i D_i^3 \Big/ \sum_{i=1}^{n} n_i D_i^2 \tag{6-88}$$

式中：D_i 为测定的气泡直径；n_i 是直径为 D_i 的气泡的个数。

不同大小气泡的 k_L 可由经验式计算，扩散系数 D_{AB} 对 k_L 的影响呈 1/2 次方或 2/3 次方的关系，而根据 3 种传质机制：双膜理论、渗透扩散理论和表面更新理论，D_{AB} 对 k_L 的关系为 1/2 ~ 1 次方，正好是相符的。

需要强调的是，经验式是在特定的实验条件下获得的。式中常数项与介质、物理条件、反应器形状和大小、操作方法等有关，因此对不同的系统，应通过自己的实验来回归系数和指数。

k_L 还与气泡直径和局部水力学条件有关。从传质观点看，生物反应器中的气泡运动可以分为两类：气泡自由上升型（如鼓泡塔、气升式发酵罐以及工业规模的搅拌罐）和高湍动型（主要为实验室小规模搅拌罐）。大型搅拌罐的传质很少受叶轮周围的湍动条件影响，

因此归类于气泡自由上升型。

在低黏度、低密度发酵液的培养中，平均气泡直径为 0.5 ~ 3mm。但在较高的细胞浓度（大于 $5g \cdot L^{-1}$）或醇浓度（如乙醇）下，平均气泡直径趋于低值（0.5 ~ 1.2mm）。在黏性介质中，气泡在反应器中的停留时间长，对传质作用很小，会给估计 k_La 值带来影响。

在水一类的介质中，单气泡上升速度为 4 ~ 25cm/s；气泡直径小于 2mm 时，速度随气泡直径增大而增大，当直径达 2mm 后，上升速度变平缓。

低密度单细胞培养的黏度与水接近，但由于介质中有细胞，除直径大于 3mm 的气泡外，多数气泡都是刚性的，上升速度明显减小。

非牛顿型流体的气泡平均直径要大得多（忽略不运动的小气泡）。

通气发酵中微生物细胞的密度多数在 $1 \sim 50g \cdot L^{-1}$ 范围内。单细胞微生物如酵母和细菌的呼吸速率为 $100 \sim 600mg \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 的水平。多数细菌的呼吸酶都在细胞膜上，氧也主要消耗在那里。酵母呼吸发生在细胞内部，氧要扩散通过细胞膜才能被利用。微生物细胞有吸附在界面的趋势，会影响界面处氧的传递，产生 3 种不同的作用：由反应而增加吸收；改变界面处氧的扩散系数而降低 k_L；改变界面处水力学性质。研究还表明，许多微生物有直接从气相摄取氧的能力，在酵母发酵中就发现了这种现象。高密度培养中，这种作用更加重要。

影响 k_L 的因素很多，除扩散系数和水力学条件外，还有液体黏度、表面活性剂、电解质和消泡剂等。因此虽然 k_L 的关联式很多，但多数不能套用，而应当根据具体情况进行修正。例如，计算搅拌罐的 k_L，忽略功率消耗和气体流动的影响，25℃下氧在水中的传质系数 k_L 为 $4.58 \times 10^{-4} m \cdot s^{-1}$，而根据涡轮桨单位体积功率消耗的经验式计算的 k_L 却在 $7.3 \times 10^{-4} \sim 3.4 \times 10^{-3} m \cdot s^{-1}$ 内变化。

6.5.5　界面面积的测定

界面面积的测定方法有照相法、光导法和毛细管法等。

1. 照相法　直接从照片上量出各气泡的直径，然后根据式（6-88）计算出 Souter 平均值 D_{32}。根据 D_{32} 和气含率 H 计算界面面积：

$$a = 6H/D_{32} \tag{6-89}$$

照相法是几种方法中最直接的，但要得到清晰的照片较困难，且读图很费时。显微照相装置如图 6-31 所示。

该装置适用于确定 0.1 ~ 3mm 的气泡。装置包括电机驱动的照相机、引伸管、4 倍放大的物镜和一个防护镜（用以限制物镜和目标平面间散布的气泡和干扰）。用带光纤维镜片的电子快门将目标照亮，同时照下移动的气泡。

2. 光导法　当一束光通过气液分散区域时，光会被气泡分散，吸光率的全数与单位体积的界面面积成正比。

$$1/T = m_1 + m_2 a \tag{6-90}$$

理论上，只要气泡是近似球形的，则 m_1 为 1，m_2 为与气泡大小无关的常数。

光导法较为常用，可用于在线检测，测定较快。

光导法中的探头由镜化处理的玻璃棒构成或由光导纤维镜片构成。图 6-32 是光导装置的示意图。该装置由分光光度计和软光导纤维镜片构成。

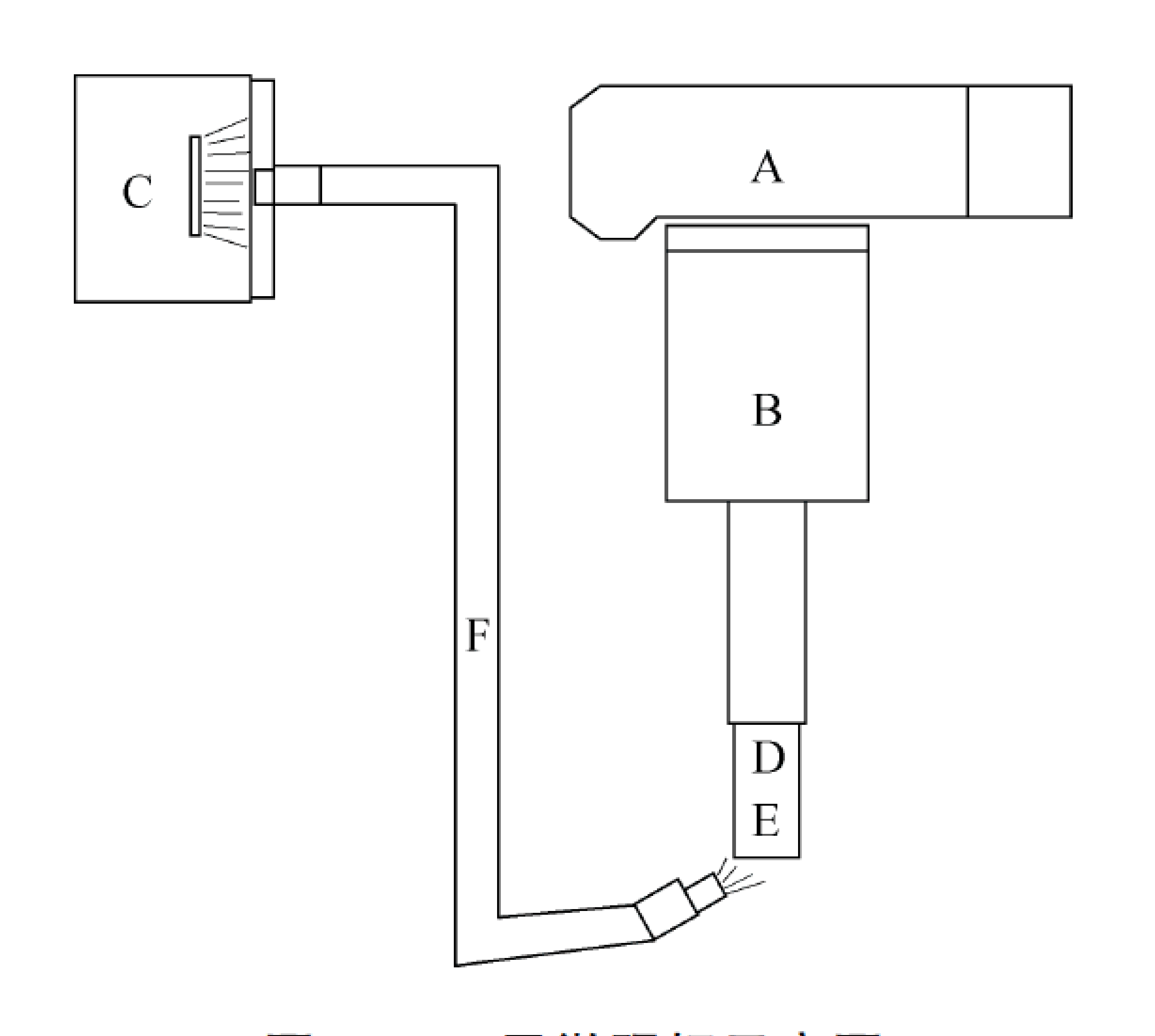


图 6-31 显微照相示意图

A：照相机；B：引伸管；C：闪光；
D：物镜；E：防护罩；F：纤维散光导向装置

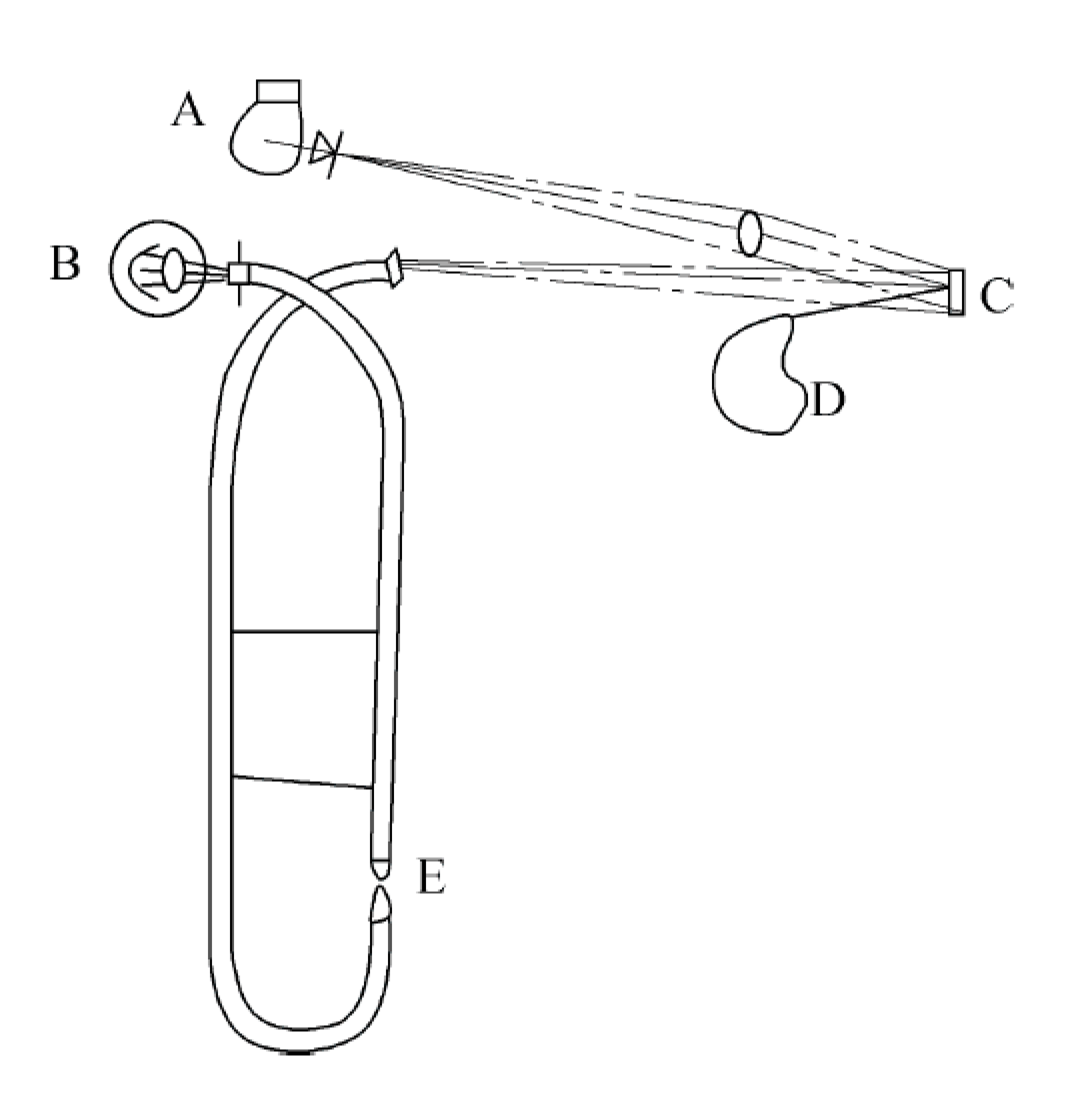


图 6-32 光导技术示意图

A：灯泡；B：摄影管；C：分散板；
D：波长凹凸轮；E：探头

3. 毛细管法 将带喇叭头的毛细管插入气液混合液中，喇叭头用以捕集流经的气泡，避免气泡破碎。气泡通过毛细管时，用红外线测定。该法适用于测定较小的气泡。

6.6 热量传递

热是能量的一种形式，热量的传递是由于温差引起的，热量从高温区传递到低温区。根据传热机制的不同，热传递的方式可分为 3 种：传导、对流和辐射，传热可依靠其中的一种或几种方式同时进行。生物反应过程中温度的调节与保持、过多反应热的移除、灭菌等都离不开传热，可以说热量的传递是一切生物过程的保障。

6.6.1 传热原理

1. 热传导 又称导热，指的是物体各部分之间不发生相对位移，仅借助分子、原子或自由电子等微观粒子的热运动而引起的热量传递过程。热传导在固体、液体和气体中均可进行，但其微观机制因物态而异。在非金属固体和大部分液体中，热传导是依靠原子或分子在其平衡位置附近的振动即晶格结构的振动来实现的；在气体中，热传导是由于分子的不规则运动而引起的；而金属固体则主要依靠自由电子的运动进行导热。固体的导热能力与自由电子的浓度有直接关系，在非金属固体中，自由电子很少，而各种合金中的自由电子浓度变化很大。因此，毫无疑问，纯金属是最好的热导体。主要依靠导热方式传热的例子有通过换热器或冷冻器壁的传热等。

2. 热对流 它是依靠流体各部分之间发生相对位移而进行的热传递。在流体中产生对流的原因有：一是自然对流，即由于流体中各处的温度不同而引起密度的差别，使轻者上浮，重者下沉，流体质点产生相对位移而发生对流；二是强制对流，即由于泵、风机或搅拌等外力作用所引起的质点强制运动。

热对流只发生在流体中，但在化工传热过程中，流体流过固体壁面时常产生对流和传热联合作用，即热由流体传到固体表面（或反之），通常将这一过程称为对流传热。对流传热的特点是靠近壁面的流体层依靠热传导方式传热，而在流体主体中则主要依靠对流方式传热。由此可见，对流传热与流体流动状况密切相关，由于热对流总伴随着热传导，因此，一

般并不讨论单纯的热对流，而是着重讨论具有实际意义的对流传热。

3. 热辐射　辐射依靠电磁波的形式在空间传递热量，它与导热和对流传热的不同点在于辐射不需要任何介质，所有物体（包括固体、液体和气体）都能将热能以电磁波的形式发射出去。辐射到另一个物体的热能可以部分地被反射、被透过或被吸收，只有被吸收的辐射热能才能使这一物体变热。

自然界中一切物体都在不停地向外发出辐射能，同时又不断地吸收来自其他物体的辐射能，并将其转变为热能。物体之间相互辐射和吸收能量的总结果称为辐射传热。由于高温物体发射的能量比吸收的多，而低温物体则相反，从而使净热量从高温物体传向低温物体。辐射传热的特点是：不仅有能量的传递，而且还有能量形式的转换，即在放热处，热能转变为辐射能，以电磁波的形式向空间传送；当遇到另一个能吸收辐射能的物体时，即被其部分地或全部地吸收而转变为热能。应当指出的是，任何物体只要在绝对零度以上，都能发生辐射能，但是只有在物体温度较高时，热辐射才能成为主要的传热方式。

6.6.2　稳态传热

根据能量守恒定律，总能量衡算方程可表示为：累积的能量速率 = 输入的能量速率 - 输出的能量速率。稳态传热指累积能量等于零的传热过程，即输入的能量速率 = 输出的能量速率。所谓稳态传热过程，其传热速率在任何时刻都是常数，并且系统中各点的温度不随时间变化。稳态传热的不同传热方式的表达式为微分表达式，如傅里叶（Fourier）定律等。

1. 热传导

1）傅里叶定律：对于化工的 3 种主要传递过程——动量传递、热量传递和质量传递过程，传递速率的基本方程都可以表示为

$$\text{过程传递速率} = \frac{\text{过程推动力}}{\text{过程阻力}}$$

因为热传导主要是一种分子现象，是微观粒子运动特性的表现，因此依靠导热传递热量也遵循这个方程，其过程推动力即为温度差。可表示为傅里叶定律的形式，即：

$$\frac{Q}{A} = -k\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}x} \tag{6-91}$$

式中：Q 为单位时间在 x 方向上的导热速率（W），其方向与温度梯度相反；A 为与热流方向相垂直的等温表面的面积（m^2）；k 为热导率（$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$）；$\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}x}$ 为 x 方向的温度梯度；Q/A 为热通量，即在 x 方向上单位时间通过单位面积的热量（$W \cdot m^{-2}$），可用 q 表示；x 为热量传递的最短距离（m）；方程中的负号表示热流方向总是和温度梯度的方向相反。

2）热导率：式（6-91）可改写为

$$k = -\frac{Q}{A\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}x}} \tag{6-92}$$

式（6-92）即为热导率的定义式，由式（6-92）可知，热导率在数值上等于单位温度梯度下的热通量。热导率是物质的物理性质之一，表征了物质导热能力的大小，其数值和物质的组成、结构、密度、温度以及压强有关。由导热系数的定义式，可用实验方法测定各种物质的热导率。表 6-11 给出了一般情况下各类物质的热导率的大致范围，表 6-12 给出了一些物质的热导率。由表中数据可知，一般来说，金属的热导率最大，非金属固体次之，液体较小，

气体最小。

表 6-11　物质热导率（k）的数量级

物质种类	气体	液体	非导固体	金属	绝热材料
k（$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$）	0.006～0.6	0.07～0.7	0.2～3.0	15～420	<0.25

表 6-12　某些物质在 101.325kPa（1atm）压力下的热导率（k）

物　质	热力学温度（K）	k（$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$）
气体		
空气	273	0.0242
	373	0.0316
氢气	273	0.167
n-丁烷	273	0.0135
液体		
水	273	0.569
	366	0.680
苯	303	0.159
	333	0.151
生物体和食物		
橄榄油	293	0.168
	373	0.164
瘦牛肉	263	1.35
脱脂乳	275	0.538
苹果酱	296	0.692
鲑鱼	277	0.502
	248	1.30
固体		
冰	273	2.25
耐火砖	473	1.00
纸		1.130
硬橡胶	273	0.151
软木板	303	0.043
石棉	311	0.168
玻璃纤维	266	0.029
钢铁	291	45.3
	373	45
铜	273	388
	373	377
铝	273	202

固体不存在对流流动问题，因此其热导率可以十分精确地测量出来。金属是最好的导热体，纯金属的热导率一般随温度升高而降低。金属的热导率大多随其纯度的增高而增大，因此，合金的热导率一般比纯金属要低。非金属固体的热导率与温度、组成及结构的紧密程度有关，通常随密度增加而增大，随温度升高而增大。

液体可分为金属液体和非金属液体，液态金属的热导率比一般液体的要高。在液态金属

中，纯钠具有较高的热导率，大多数液态金属的热导率随温度升高而降低。在非金属液体中，水的热导率最大，除了水和甘油外，液体的热导率随温度升高略有减小。一般来说，纯液体的热导率比其他溶液的要大。必须注意，通过实验确定的热导率，必须是在液体没有对流流动的情况下得出的。液体的热导率随温度的变化不大，通常可用线性关系表示为

$$k = a + bT \tag{6-93}$$

气体的热导率随温度升高而增大。在相当大的压强范围内，气体的热导率随压强的变化甚微，可以忽略不计。只有在过高或过低的压强（$>2\times10^5$kPa 或 <3kPa）下，才考虑压强的影响，此时随压强增高，热导率增大。气体的热导率很小，对导热不利，但有利于保温。工业上所用的保温材料，例如玻璃棉等，就是因为其空隙中有气体，所以其热导率低，适于保温隔热。由于气体的导热是通过分子不断地无规则运动，彼此碰撞来交换能量和动量而引起的，而小分子的移动较快，故在气体中，氢气具有较高的热导率。

3）热扩散系数 α：热扩散系数定义为

$$\alpha = \frac{k}{\rho c_{\mathrm{P}}} \tag{6-94}$$

式中：α 为热扩散系数（$\mathrm{m^2\cdot s^{-1}}$）；c_{P} 为等压比热容（$\mathrm{J\cdot kg^{-1}\cdot K^{-1}}$）；$\rho$ 为密度（$\mathrm{kg\cdot m^{-3}}$）。

4）几种不同条件下的热传导

（1）单层平壁的热传导：如图 6-33 所示，假设平壁材料均匀，热导率 k 不随温度而变化（或取平均热导率），平壁内的温度仅沿垂直于壁面的 x 方向变化，平壁面积与厚度相比是很大的，故从壁的边缘处损失的热量可以忽略。因此，可以看做是稳态的一维平壁热传导，导热速率 Q 和传热面积 A 都为常数，有：

$$q = \frac{Q}{A} = -k\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}x} = -k\frac{\Delta T}{\Delta x} = k\frac{T_1 - T_2}{x_2 - x_1} \tag{6-95}$$

由上式可得：

$$Q = \frac{\Delta T}{\Delta x/kA} = \frac{\Delta T}{R} = \frac{\text{推动力}}{\text{阻力}} \tag{6-96}$$

式中：Δx 为平壁厚度（m）；ΔT 为温度差（K），它是导热推动力。

由此可得导热热阻：

$$R = \Delta x/kA \tag{6-97}$$

式中，R 为导热热阻（K/W）。

式（6-95）表明，若用 T 代替 T_2，x 代替 x_2，则温度随距离呈线性变化。

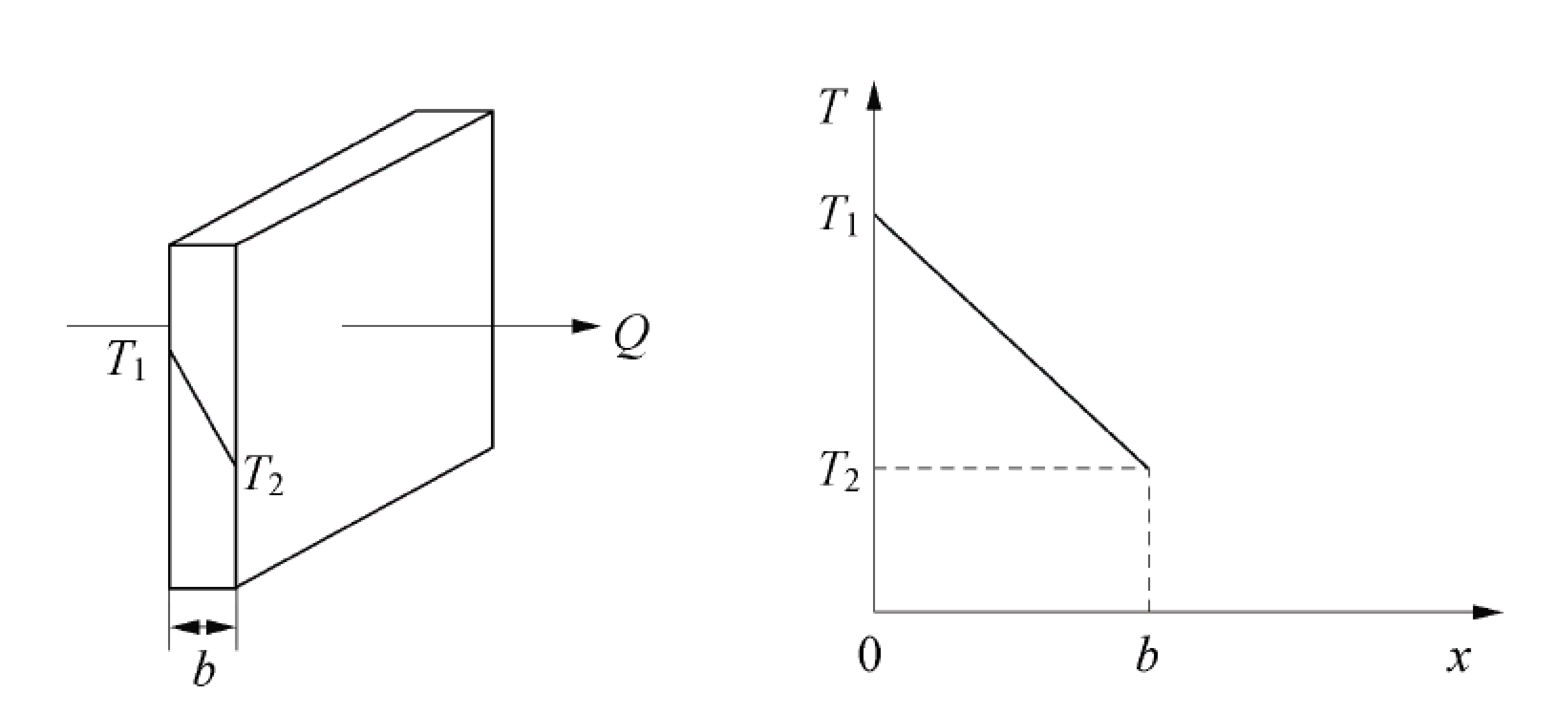


图 6-33　单层平壁的热传导

式（6-95）适用于 k 为常数的稳态热传导过程。在实际实用中，物体内不同位置的温度并不相同，因而热导率也随之而异。在工程计算中，对于各处温度不同的固体，其热导率可以取固体两侧面温度下 k 的算术平均值，或取两侧面温度算术平均值下的 k。可以证明，当热导率随温度呈线性关系时，用物体的平均热导率进行热传导的计算，不会引起太大的误差。

由式（6-97）可知，系统中任一段的热阻与该段的温度差成正比，利用这一关系可以计算界面温度或物体内温度分布。反之，可以从温度分布情况判断各部分热阻的大小。此外，还可利用串、并联电阻的计算方法来类比计算复杂导热过程的热阻。

（2）多层平壁的热传导：以三层平壁为例，各层的壁厚分别为 Δx_1、Δx_2、Δx_3，热导率分别为 k_1、k_2、k_3。假设各层之间接触良好，即相接触的两表面温度相同，各表面温度分别是 T_1、T_2、T_3、T_4，且 $T_1 > T_2 > T_3 > T_4$。在稳态传热时，通过各层的导热速率必然相等，可写出每一层的 Fourier 方程：

$$Q = k_1 A\frac{T_1 - T_2}{\Delta x_1} = k_2 A\frac{T_2 - T_3}{\Delta x_2} = k_3 A\frac{T_3 - T_4}{\Delta x_3} \tag{6-98}$$

可解出每一个方程的 ΔT，

$$\Delta T_1 = T_1 - T_2 = Q\frac{\Delta x_1}{k_1 A},\quad \Delta T_2 = T_2 - T_3 = Q\frac{\Delta x_2}{k_2 A},\quad \Delta T_3 = T_3 - T_4 = Q\frac{\Delta x_3}{k_3 A} \tag{6-99}$$

把三个方程相加，消去中间温度 T_2、T_3，最后整理为：

$$Q = \frac{T_1 - T_2}{\dfrac{\Delta x_1}{k_1 A} + \dfrac{\Delta x_2}{k_2 A} + \dfrac{\Delta x_3}{k_3 A}} = \frac{T_1 - T_4}{R_1 + R_2 + R_3} \tag{6-100}$$

式（6-100）即为三层平壁的传热速率方程式。最终，热流速率方程表示成总温差（$T_1 - T_4$）和总热阻（$R_1 + R_2 + R_3$）的关系。

对 n 层平壁，热传导速率方程式为：

$$Q = \frac{T_1 - T_n}{\sum\limits_{i=1}^{n} \dfrac{\Delta x_i}{k_i A}} \tag{6-101}$$

式中，下标 i 表示平壁的序号。

在上述多层平壁的计算中，预先假设了层与层之间接触良好，两个接触表面有相同的温度。实际上，不同材料构成的界面之间可能出现明显的温度降低。这种温度变化是由于表面粗糙不平而产生接触热阻的缘故。因两个接触面之间有空穴，而空穴内又充满空气，因此，传热过程包括通过实际接触面的热传导和通过空穴的热传导（高温时还有辐射传热）。一般来说，因气体的热导率很小，接触热阻主要由空穴造成。

接触热阻与接触面的材料、表面粗糙度即接触面上压强等因素有关，目前还没有可靠的理论或经验计算公式，主要依靠实验测定。表 6-13 为几组材料的接触热阻值。

表 6-13　几种接触表面的接触热阻

接触面材料	粗糙度（μm）	温度（℃）	表压强（atm）	接触热阻（$m^2 \cdot ℃ \cdot W^{-1}$）
不锈钢（磨光），空气	2. 54	90 ~ 200	3 ~ 25	2.64×10^{-4}
铝（磨光），空气	2. 54	150	12 ~ 25	8.8×10^{-5}
铝（磨光），空气	0. 25	150	12 ~ 25	1.8×10^{-5}
铝（磨光），空气	1. 27	20	12 ~ 200	7.0×10^{-6}

(3) 单层圆筒壁的热传导：圆筒壁热传导与平壁传导的不同之处在于圆筒壁的传热面积不是常量，随半径而变，同时温度也随半径而变（图 6-34）。

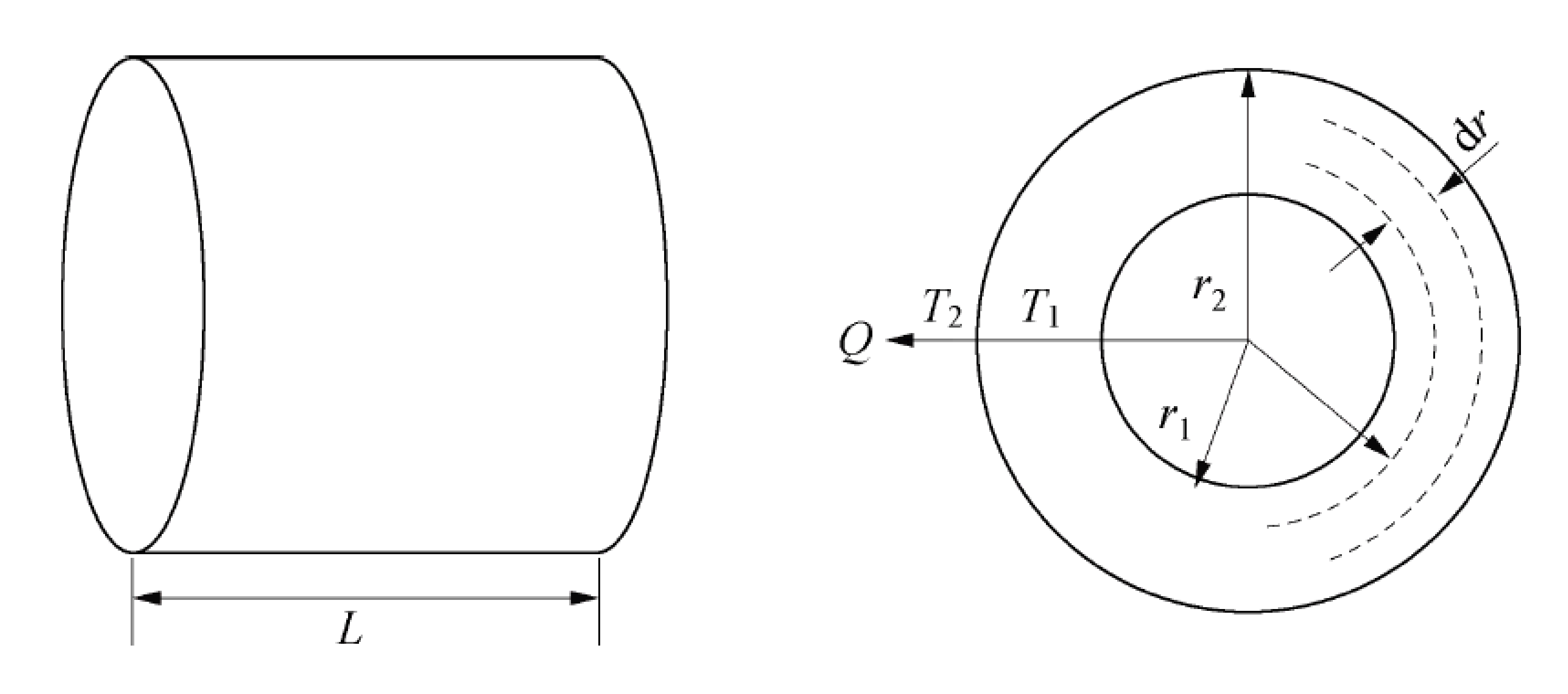


图 6-34　单层圆筒壁的热传导

筒壁，其内表面半径为 r_1，温度为 T_1，外表面半径为 r_2，温度为 T_2，且 $T_1 > T_2$，管长为 L，热量沿半径方向从内表面传到外表面。若在圆筒壁半径 r 处沿半径方向取微分厚度 dr 的薄壁圆筒，其传热面积 A 可视为常量，等于 $2\pi rL$，同时通过该薄层的温度变化为 dT。则 Fourier 定律可写为

$$q = \frac{Q}{A} = \frac{Q}{2\pi rL} - k\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}r} \tag{6-102}$$

整理并积分得

$$Q = k\frac{2\pi L}{\ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)}(T_1 - T_2) = kA_m\frac{T_1 - T_2}{r_2 - r_1} = \frac{T_1 - T_2}{\frac{r_2 - r_1}{kA_m}} = \frac{T_1 - T_2}{R}$$

$$A_m = 2\pi r_m L = \frac{A_2 - A_1}{\ln\frac{A_2}{A_1}}, \quad r_m = \frac{r_2 - r_1}{\ln\frac{r_2}{r_1}} \tag{6-103}$$

A_m 是对数平均面积，如果 $A_2/A_1 < 1.5$，工程上可用算术平均面积 $(A_1 + A_2)/2$ 代替对数平均面积，其误差不大于 1.5%。若用 r 代替 r_2，用 T 代替 T_2，由上式可知温度是 $\ln r$ 的线性函数，而不是像在平板时那样，温度是 r 的线性函数。

(4) 多层圆筒壁的热传导：在加工工业中，常见通过多层圆筒壁的传热问题，例如通过绝热管壁的热量传递。假设各层间接触良好，各层的热导率分别为 k_1、k_2、k_3。在稳态导热时，通过每层管壁的导热速率 Q 应当是相等的。对于每一同心圆筒，写出与式（6-103）类似的方程。

$$Q = \frac{T_1 - T_2}{\frac{r_2 - r_1}{k_1 A_{m_1}}} = \frac{T_2 - T_3}{\frac{r_3 - r_2}{k_2 A_{m_2}}} = \frac{T_3 - T_4}{\frac{r_4 - r_3}{k_3 A_{m_3}}}$$

$$A_{m_1} = \frac{A_2 - A_1}{\ln\frac{A_2}{A_1}}, \quad A_{m_2} = \frac{A_3 - A_2}{\ln\frac{A_3}{A_2}}, \quad A_{m_3} = \frac{A_4 - A_3}{\ln\frac{A_4}{A_3}} \tag{6-104}$$

采用与多层平壁同样的方法，合并方程消去 T_2 和 T_3，最终方程为：

$$Q = \frac{T_1 - T_4}{\sum R_i}, \quad R_i = \frac{\mathrm{r}_{i+1} - \mathrm{r}_i}{\mathrm{k}_i \mathrm{A}_{m_i}} \tag{6-105}$$

可知总热阻同样是串联的各层热阻之和。

（5）通过并联物体的导热：若两块平板 A 和 B 并联排列，热流的方向是垂直于每块板的表面。则总热流等于通过固体 A 和固体 B 的热流之和。写出每块板的 Fourier 方程并相加，得总热流速率为

$$Q = Q_A + Q_B = k_A A_A \frac{T_1 - T_2}{\Delta x_A} + k_B A_B \frac{T_3 - T_4}{\Delta x_B} \tag{6-106}$$

式中：T_1 和 T_2 为物体 A 的迎面和背面温度；T_3 和 T_4 为物体 B 的迎面和背面温度。

假设 $T_1 = T_3$（对 A 和 B 来讲，迎面温度是相同的），并且 $T_2 = T_4$（背面温度相等），则有

$$Q = \frac{T_1 - T_2}{\Delta x_A / k_A A_A} + \frac{T_1 - T_2}{\Delta x_B / k_B A_B} = \left(\frac{1}{R_A} + \frac{1}{R_B}\right)(T_1 - T_2) \tag{6-107}$$

例如，加热窑的绝热砖墙 A 上沿墙厚度方向平行插入加强用的钢条 B。虽然钢条的截面积 A_B 比起绝热砖墙的面积 A_A 要小得多，但金属的热导率比砖大几百倍，所以由钢条可以导出很大一部分热损失。

另外一个例子是用增加热传导的方法加速肉的冷冻干燥。在冻肉中的金属钉子能将热量更快地传导到肉里。

需要指出，若并联材料的热导率相差很大，则可能出现二维热流。这样应用上式的结果多少要受一些影响。

2. 对流传热

1）对流传热的分析：如前所述，由于流体质点的宏观运动引起的热传递称为热对流。当流体内部温度分布不均匀时必然发生热传导，因此流体的热对流总是伴随着热传导。通常，将流体流过固体壁面（流体温度和壁面温度不同）时的传热过程称为对流传热。也就是说对流传热是指流体与固体壁面间的传热过程，它在化工传热过程（如换热器）中最具有实际意义。由于对流传热主要是借流体质点的移动和混合来完成的，因此对流传热与流体的流动状况密切相关。

从流体流动的角度来讲，当流体流过固体壁面时，由于流体的黏性作用，使壁面附近的流体减速而形成流动边界层，边界层内存在速度梯度。当边界层内的流动处于滞流状态时，称为滞流边界层；当边界层内的流动发展为湍流时，称为湍流边界层。但是，即使是湍流边界层，靠近壁面处仍有一膜层（滞留内层）存在，在此膜层内流体呈滞流流动。滞留内层和湍流主体之间称为缓冲层。由于滞留内层中流体分层运动，相邻层间没有流体的宏观运动，因此在垂直于流动方向上不存在热对流，该方向上的热传递仅为流体的热传导（实际上，在滞流流动时的传热总是要受到自然对流的影响，使传热加剧）。由于流体的热导率较低，使滞留内层内的导热热阻很大，因此该层中温差较大，即温度梯度较大。在湍流主体中，由于流体质点的剧烈混合并充满旋涡，因此湍流主体中温度差（温度梯度）极小，各处的温度基本上相同。在缓冲层内，热对流和热传导的作用大致相同，在该层内温度发生较缓慢的变化。

由以上分析可知，对流传热是集热对流和热传导于一体的综合现象。对流传热的热阻主要集中在滞流层内，因此，减小滞流内层的厚度是强化对流传热的主要途径。

2）壁面和流体间的对流传热速率：由前面的分析可知，对流传热是一个复杂的传热过程，影响对流传热速率的因素很多。因此对流传热的纯理论计算是相当困难的。目前，工程计算仍按下面的半经验方法处理。

根据传递过程速率的普遍关系，壁面与流体间（或反之）的对流传热速率，也应该等

于推动力和阻力之比，即：

$$\text{对流传热速率} = \frac{\text{对流传热推动力}}{\text{对流传热阻力}} = \text{系数} \times \text{推动力}$$

上式中的推动力是壁面和流体间的温度差。影响阻力的因素很多，但有一点是明确的，即阻力必然与壁面的表面积成反比。还应指出，在换热器中，沿流体流动方向，流体和壁面的温度一般是变化的，在换热器不同位置的对流传热速率也随之而异，所以对流传热速率方程应该用微分形式表示。

以热流体和壁面间的对流传热为例，对流传热速率方程可以表示为

$$\mathrm{d}Q = \frac{T - T_W}{1/(h\mathrm{d}A)} = h(T - T_W)\mathrm{d}A \tag{6-108}$$

式中：$\mathrm{d}Q$ 为局部对流传热速率（W）；$\mathrm{d}A$ 为微分传热面积（m^2）；T 为换热器的任一截面上热流体的平均温度（K）；T_W 为换热器的任一截面上与热流体相接触一侧的壁面温度（K）；h 为对流传热膜系数（$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$）。

上式又称牛顿冷却定律，也是对流传热膜系数的定义式，表示在单位温度差下，对流传热系数在数值上等于由对流传热产生的热通量（即单位面积的对流传热速率）。一般来说，影响 h 的因素有系统的几何形状、流体和流动的性质以及温差 ΔT 等。表 6-14 列出几种对流传热情况的 h 值范围。同时在实际的传热计算中，h 的经验值也是值得参考的。

表 6-14　对流传热膜系数 h 值的范围

换热方式	h（$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$）
空气自由对流	5～25
空气强制对流	25～250
水自然对流	20～1000
水强制对流	1000～15000
水蒸气冷凝	5000～15000
有机蒸汽冷凝	500～2000
水沸腾	2500～25000

3）热边界层：正如流体流过固体壁面时形成流动边界层一样，若流体自由流动的温度和壁面的温度不同，必然会形成热边界层（又称温度边界层）。

当温度为 T_∞ 的流体在表面温度为 T_W 的平板上流过时，流体和平板间进行换热。实验表明，在大多数情况下（热导率很大的流体除外），流体的温度也和速度一样，仅在靠近板面的薄层流体中有显著的热传导，即在此薄层中存在温度梯度，将此薄层定义为热边界层。在热边界层以外的区域，流体的温度基本上相同，即温度梯度可视为零。热边界层的厚度用 δ_T 表示。通常规定 $T_W - T = 0.99\ (T_W - T_\infty)$ 处为热边界层的界限，其中 T 为热边界任一局部位置的温度。大多数情况下，流动边界层的厚度大于热边界层的厚度。显然，热边界层是对流传热的主要区域。平板上热流边界层的形成和发展如图 6-35 所示。

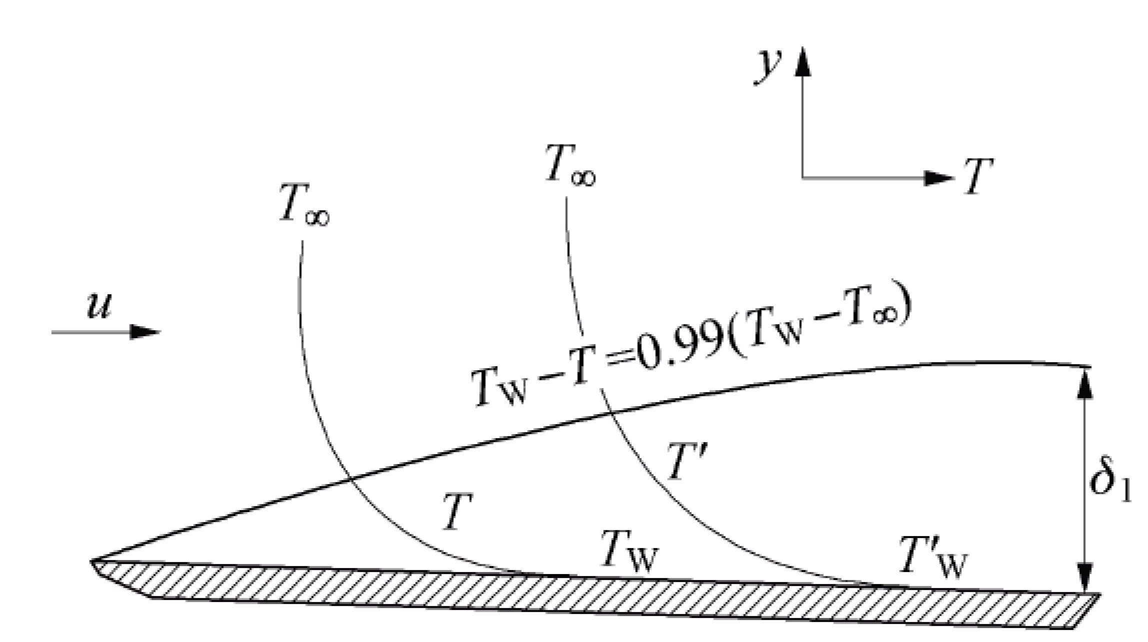


图 6-35　平板上的热边界层

由图6-35可以看出，热边界层越薄，层的温度梯度越大。若紧靠壁面附近薄层流体（滞流层）中的温度梯度用dt/dy表示，由于通过这一薄层的传热只能是流体间的热传导，因此传热速率可用Fourier定律表示，即

$$dQ = -k dA \left(\frac{dt}{dy}\right)_W \tag{6-109}$$

式中：y为与壁面相垂直方向上的距离（m）；dt/dy为壁面附近流体层内的温度梯度（K·m^{-1}）。由式（6-108）和式（6-109）可得

$$h = -\frac{k}{T - T_W}\left(\frac{dt}{dy}\right)_W = -\frac{k}{\Delta t}\left(\frac{dt}{dy}\right)_W \tag{6-110}$$

式（6-110）是对流传热系数h的另一定义式，表明对于一定的流体和温度差，只要知道壁面附近的流体层的温度梯度，就可由式（6-110）求得h_∞。显然，由于影响h的因素很复杂，目前仅能获得少数较简单条件的h分析解，对于其他情况仍需通过经验公式来计算h的值。但式（6-110）是理论上分析和计算h的基础。

热边界层的厚薄影响层内的温度分布，因而影响温度梯度。当边界层内、外侧的温度差一定时，热边界层越薄，则$\left(\frac{dt}{dy}\right)_W$越大，因而$h$就越大，反之则相反。

流体在管内流动时，热边界层的发展过程也和流动边界层的相似。流体进入管口后，边界层开始沿管长而增厚；在距管入口一定距离处，于管中心相汇合，边界层厚度等于管半径，此时称为充分发展流动。但是温度分布与速度分布不同，当管长在增加时，温度分布将逐渐变得更为平坦；当通过很长的管后，温度梯度可能消失，此时传热也就停止了。

流体在管内传热时，从开始加热（或冷却）到h达到基本稳定的这一段距离称为进口段。在进口段内，h将沿管长逐渐减小，这是由于热边界层厚度逐渐增加的缘故。若边界层在管中心汇合前已发展为湍流时，则在变为湍流的过渡段内，h将有所增大，然后趋于恒定。

从进口段的简单分析可知，管材的尺寸和管口形状对h有较大影响。在传热管的长度小于进口段以前，管越短，则边界层越薄，h就越大。对于一定的管长，破坏边界层的发展也能强化对流传热。

4）对流传热系数的影响因素：对流传热速率方程看来非常简单，实际上是将对流传热的复杂性和计算上的困难都转移到对流传热系数之中。由对流传热机制分析可知对流传热系数h决定于热边界层内的温度梯度。而温度梯度或热边界层的厚度与流体的物化特性、温度、流动状况以及几何形状等诸多因素有关。

（1）流体的种类和相变化的情况：液体、气体和蒸汽的对流传热系数都不相同。牛顿型流体和非牛顿型流体的也有区别。

（2）流体的物性：对h值影响较大的流体物性有热导率、黏度、比热容、密度以及对自然对流影响较大的体积膨胀系数。对于同一种流体，这些物性又是温度的函数，其中某些物性还与压强有关。

① 热导率：通常对流传热的热阻主要由边界层内的热阻构成，因为即使流体呈湍流状态，湍流主体和缓冲层的传热热阻较小，此时对流传热主要受滞流内层热阻控制。当滞流内层的温度梯度一定时，流体的热导率越大，对流传热系数也越大。

② 黏度：由流体流动规律可知，当流体在管内流动时，若管径和流速一定，流体的黏度越大，其 Re 值越小，即湍流程度越低，因此热边界层越厚，于是对流传热系数也就越低。

③ 比热容：ρc_p 代表单位体积流体所具有的热容量，也就是说 ρc_p 值越大，表示流体携带热量的能力越强，因此对流传热的强度越强。

④ 体积膨胀系数：一般说来，体积膨胀系数 β 值越大的流体，所产生的密度差别越大，因此有利于自然对流。由于绝大部分传热过程并非定温流动，因此即使在强制对流的情况下，也会产生附加的自然对流的影响，因此 β 值对强制对流也有一定影响。

（3）流体的温度：流体温度对对流传热的影响表现在流体温度与壁面温度之差 ΔT、流体物性随温度变化程度以及附加自然对流等方面的综合影响。因此在对流传热计算中必须修正温度对物性的影响。此外，由于流体内部温度分布不均匀必然导致密度的差异，从而产生附加的自然对流，这种影响又与热流的方向及管子安放情况等有关。

（4）流体的流动状态：滞流和湍流的传热机制有本质的区别。当流体成滞流时，流体沿壁面分层流动，即流体在热流方向上没有涡流运动，传热基本上依靠分子扩散作用的热传导来进行，当流体呈湍流时，湍流主体的传热为涡流作用引起的热对流，在壁面附近的滞流内层中仍为热传导。涡流致使管子中心温度分布均匀，滞流内层的温度梯度增大。由此可见，湍流时的对流传热系数远比滞流时的大。

（5）流体流动的原因：自然对流和强制对流的流动原因不同，因而具有不同的流动和传热规律。

自然对流是由于流体内部存在温度差，因而各部分的流体密度不同，引起流体质点的相对位移。设 ρ_1 和 ρ_2 分别代表温度为 T_1 和 T_2 两点流体密度，则密度差产生的升力为（$\rho_1-\rho_2$）g，则可得 $\rho_1=\rho_2(1+\beta\Delta t)$，于是每单位面积的流体所产生的升力为

$$(\rho_1-\rho_2)g=[\rho_2(1+\beta\Delta t)-\rho_2]g=\rho_2\beta g\Delta t \quad \text{或} \quad \frac{\rho_1-\rho_2}{\rho_2}=\beta\Delta T \qquad (6\text{-}111)$$

强制对流是由于外力的作用，例如泵、搅拌器等迫使流体流动。通常，强制对流传热系数要比自然对流传热系数大几倍至几十倍。

（6）传热面的形状、位置和大小：传热面的形状（如管、板、环隙、翅片等）传热面方位和布置（如水平或垂直放置、管束的排列方式）及流动尺寸（如管井、管长、板高和进口效应等）都直接影响对流传热系数。这些影响因素比较复杂，但都反应在 h 的计算公式中。

3．辐射

1）辐射传热的本质：辐射传热与对流传热的区别，是不要求通过介质进行传递。辐射传热是依靠电磁波辐射来传递热量的。

热辐射是电磁波的一种形式，与 X 射线、光波和 γ 射线等类似，仅波长不同而已。它与光的传播规律相同，即按直接传播，可以通过空间和真空传递。它是一种重要的传热形式，尤其是在温差较大时更为重要。如锅炉燃烧室、辐射干燥箱和食品烘箱等。辐射通常是和导热、对流同时发生的。

从本质上看，辐射传热是由 3 个不同步骤组成：①热源的热能，例如温度为 T_1 的炉壁，转变为电磁辐射波的能量；②电磁波以直线方式通过中间介质，传到温度为 T_2 的冷

物体，例如充满水的被加热的炉管；③投射到物体上的电磁波被物体所吸收并重新转变为热能。

假设投射到某一物体上的总辐射能量为 Q，则其中有一部分能量被吸收，一部分能量被反射，余下的能量透过物体。根据能量守恒定律，可得：

$$Q_a + Q_r + Q_d = Q$$

即

$$\frac{Q_a}{Q} + \frac{Q_r}{Q} + \frac{Q_d}{Q} = 1 \quad 或 \quad a + r + d = 1 \tag{6-112}$$

式中：a 为物体的吸收率，$a = \frac{Q_a}{Q}$，无因次；r 为物体的反射率，$r = \frac{Q_r}{Q}$，无因次；d 为物体的吸收率，$d = \frac{Q_d}{Q}$，无因次。

2）黑体、镜体、透热体和灰体：能全部吸收辐射能，即吸收率 $a = 1$ 的物体称为黑体；能全部反射辐射能，即反射率 $r = 1$ 的物体称为镜体；能透过全部辐射能，即透过率 $d = 1$ 的物体称为透热体。

黑体和镜体都是理想物体，实际上并不存在。但是，某些物体如无光泽的黑煤，其吸收率约为 0.97，接近于黑体；磨光的金属表面的反射率约为 0.97，接近于镜体。引入黑体等概念，只是作为一种实际物体的比较标准，以简化辐射传热的计算。

物体的 a、r、d 值的大小决定于物体的性质、表面状况、温度及辐射的波长等。一般来说，固体和液体都是不透热体，$d = 0$，故 $a + r = 1$。气体则不同，一般的单原子气体和对称的双原子气体均可视为透热体，因而 $r = 0$，故 $a + d = 1$。某些气体只能吸收一定波长范围的辐射能。

实际物体，如一般的固体能部分地吸收 $0 \sim \infty$ 的所有波长范围的辐射能。凡能部分地吸收 $0 \sim \infty$ 的所有波长范围的辐射能的物体定义为灰体。灰体有以下特点：①灰体的吸收率 a 不随辐射的波长而变；②灰体是不透热体。

灰体也是理想物体，但是大多数的工程材料都可视为灰体，从而可使辐射传热的计算大为简化。

3）物体的辐射和发射率：如前所述，黑体能够吸收所有落在其上的辐射能而无反射，黑体也能发射辐射能，这取决于黑体本身的温度。定义某表面的辐射能力与黑体辐射能力之比为黑度 ε（又称发射率）。对于黑体来说，$\varepsilon = 1$；对于灰体来说，$\varepsilon < 1$。

对于黑度为 $\varepsilon = 1$ 的理想黑体，辐射传热的基本方程是：

$$Q = a\sigma T^4$$

式中：σ 为黑体的辐射常数（$5.676 \times 10^{-8}\,\mathrm{W \cdot m^{-2} \cdot K^{-4}}$）；$T$ 为黑体的温度（K）。

对于黑度 $\varepsilon < 1.0$ 的灰体，其发射能力较小，为黑体的 ε 倍。

$$Q = a\varepsilon\sigma T^4 \tag{6-113}$$

ε 的值取决于物体的性质、表面状态（如表面粗糙度和氧化度），一般由实验测定。常用工业材料的黑度列于表 6-15 中。

表 6-15　常用工业材料的黑度

表面材料	温度（℃）	黑度 ε
红砖	20	0.93
耐火砖	—	0.8～0.9
氧化钢板	200～600	0.8
磨光钢板	940～1100	0.55～0.61
氧化铝	200～600	0.11～0.19
磨光铝	225～575	0.039～0.057
氧化铜	200～600	0.57～0.87
磨光铜	—	0.03
氧化铸铁	200～600	0.64～0.78
磨光铸铁	330～910	0.6～0.7
石棉板	23	0.96
油漆，所有颜料	100	0.92～0.96
水	100	0.95

6.6.3　生化反应过程的传热

生物反应器操作时对温度控制要求比较严格，并且反应器设计时传热系统配置也是重要内容，因此必须分析过程的热量平衡和反应器的传热速率。

根据经验，每立方米发酵液每小时传给冷却器最大的热量：青霉素发酵约为 25000kJ · m^{-3} · h^{-1}；链霉素发酵约为 19000kJ · m^{-3} · h^{-1}；四环素发酵约为 20000kJ · m^{-3} · h^{-1}；肌苷发酵约为 18000kJ · m^{-3} · h^{-1}；谷氨酸发酵约为 31000kJ · m^{-3} · h^{-1}。

1. 过程的热量衡算　对于一间歇反应过程，当保持反应温度不变时，以单位体积反应液为计算基准的热量平衡方程为

$$Q_E = Q_B + Q_A - Q_S - Q_V - Q_R \qquad (6\text{-}114)$$

式中：Q_E 为反应器传热速率（J · m^{-3} · s^{-1}）；Q_B 为生物反应热（J · m^{-3} · s^{-1}）；Q_A 为搅拌造成的放热速率（J · m^{-3} · s^{-1}）；Q_S 为通气带出的显热（J · m^{-3} · s^{-1}）；Q_V 为蒸发热（J · m^{-3} · s^{-1}）；Q_R 为反应液对环境的辐射热（J · m^{-3} · s^{-1}）。

反应器传热速率 Q_E，指反应器通过换热面对反应液带出或补充的热量。对微生物培养过程，常称其为发酵热。以链霉菌为主的抗生素发酵过程的最大发酵热为 12000～21000kJ · m^{-3} · h^{-1}。在控制反应器温度时，此传热速率主要决定于冷却水的温度。

生物反应热 Q_B，指细胞的生长与代谢过程中的反应热。它与能量代谢过程有关，其数值取决于细胞的种类、培养时间、碳源的种类以及浓度的变化。例如，对不同属的微生物，在以葡萄糖为主的碳源上发现反应热与细胞的摄氧率成正比，即：

$$Q_B = 519\, r_{O_2} \qquad (6\text{-}115)$$

根据其耗氧速率则很容易估算出生物反应热。

若生物反应的主要反应机制明确，反应热可以通过计算燃烧热得到。例如对于反应中碳源仅仅转化为细胞、CO_2 和 H_2O 的简单反应，则反应热与细胞燃烧热之和应与碳源的燃烧热相等。

$$
\begin{array}{ccc}
\text{碳源} + O_2 & \xrightarrow{\Delta H_S} & CO_2 + H_2O \\
\frac{1}{Y_{X/H}} \downarrow & & \uparrow \Delta H_C \\
& CO_2 + H_2O + \text{细胞} &
\end{array}
$$

$$Y_{X/H} = \frac{Y_{X/S}}{\Delta H_S - Y_{X/S}\Delta H_C} \tag{6-116}$$

式中：$Y_{X/H}$为细胞对碳源燃烧热的得率系数（$kg \cdot J^{-1}$）；ΔH_S 为碳源的燃烧热（$J \cdot kg^{-1}$）；ΔH_C 为细胞燃烧热（J/kg）；$Y_{X/S}$为细胞得率。

细胞的燃烧热一般为（2.0～2.5）$\times 10^7 J \cdot kg^{-1}$。

则反应热 Q_B 可由下式求出，即

$$Q_B = \frac{\mu c_X}{Y_{X/H}} \tag{6-117}$$

搅拌放热速率 Q_A，一般根据搅拌功率消耗换算得出。对通用式发酵罐，搅拌功率消耗值的范围为 0.5～5$kW \cdot m^{-3}$。

通气带出或带入的显热 Q_S，可根据下式计算：

$$Q_S = c_{P_g}(T_g - T_b) F_g \rho_g \tag{6-118}$$

式中：c_{P_g}为空气比热容（$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$）；$T_g$ 为空气进入时的温度（K）；T_b 为培养温度（K）；F_g 为单位体积培养基单位时间内所通入空气流量（s^{-1}）；ρ_g 为空气密度（$kg \cdot m^{-3}$）。

若 $T_g > T_b$，则为带入热量；若 $T_g < T_b$，则为带走热量。

蒸发热 Q_V，反应液中水的蒸发所带走的热量，由下式计算：

$$Q_V = \Delta H_V F_g \left(\frac{p_n}{p_T} c_{W_0} - c_{W_i}\right)$$

式中：ΔH_V 为水蒸发潜热（$J \cdot kg^{-1}$）；F_g 为单位体积培养基单位时间内所通入空气流量（s^{-1}）；p_n 为标准压力，即定义 F_g 时的压力（$N \cdot m^{-2}$）；p_T 为反应器顶部压力（$N \cdot m^{-2}$）；c_{W_0}为在罐温和罐顶压力时水蒸气质量浓度（$kg \cdot m^{-3}$）；c_{W_i}为进罐内空气中水蒸气质量浓度（$kg \cdot m^{-3}$）。

辐射热 Q_R，指向环境散失热量的速率，可用下式计算：

$$Q_R = h_W A_0 (T_b - T_E) \tag{6-119}$$

式中，h_W 为总的传热系数（$J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} \cdot K^{-1}$）；$A_0$ 为单位体积反应器所具有传热表面积（m^{-1}）；T_b、T_E 为反应器内、环境的温度（K）。

2. 反应器的换热计算 生物反应器的传热速率或总热负荷可用下式表示：

$$Q_E V_R = h_W A \Delta T_m \tag{6-120}$$

式中：V_R 为反应器有效体积（m^3）；h_W 为总的传热系数（$J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} \cdot K^{-1}$）；$A$ 为反应器的总传热面积（m^2）；ΔT_m 为培养液与冷却水的平均温差（K）。

平均温差 ΔT_m 可按下式：

$$\Delta T_m = \frac{(T_b - T_i) - (T_b - T_o)}{\ln \frac{T_b - T_i}{T_b - T}}$$

式中，T_b、T_i、T_o 分别表示培养基、冷却水入口和冷却水出口温度（K）。

反应器设计时，一般先要估算总传热系数，在已知过程的总热负荷的条件下计算总传热面积。反应器的热量传递阻力包括培养基、换热器壁、污垢层以及冷却水的传热阻力等。可以下式表示：

$$\frac{1}{h_W A}=\frac{1}{\alpha A_1}+\frac{\delta_1}{\lambda A_1}+\frac{\delta}{\lambda A_m}+\frac{\delta_2}{\lambda_2 A_2}+\frac{1}{\alpha_W A_2} \tag{6-121}$$

式中，α、α_W 为培养基、冷却水的给热系数（$J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} \cdot K^{-1}$）；$\delta$ 为换热器壁壁厚（m）；λ 为换热器壁热导率（$J \cdot m^{-1} \cdot s^{-1} \cdot K^{-1}$）；$\delta_1$、$\delta_2$ 为换热器壁两侧的垢层厚度（m）；λ_1、λ_2 为换热器壁两侧垢层的热导率（$J \cdot m^{-1} \cdot s^{-1} \cdot K^{-1}$）；$A_1$、$A_2$ 为培养基、冷却水的传热面积（m^2）；A_m 为换热器的对数平均表面积（m^2），$A_m=\dfrac{A_1-A_2}{\ln\dfrac{A_1}{A_2}}$。

对机械搅拌反应器中液体的给热系数，可根据下式估算：

$$\alpha=0.464\frac{\lambda}{D}\left(\frac{dn\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}}\left(\frac{c_P\mu}{\lambda}\right)^{\frac{1}{3}}\left(\frac{\mu}{\mu_W}\right)^{0.14} \tag{6-122}$$

式中：c_P 为培养基的比热容；D、d 为反应器、搅拌器的直径；μ、μ_W 为培养基在反应器内、换热器壁温度下的黏度。

当考虑反应器的几何形状时，式（6-122）可表示为

$$\frac{\alpha D}{\lambda}=0.85\left(\frac{dn\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}}\left(\frac{c_P\mu}{\lambda}\right)^{\frac{1}{3}}\left(\frac{\mu}{\mu_W}\right)^{0.14}\left(\frac{H}{D}\right)^{-0.56}\left(\frac{d}{D}\right)^{0.13} \tag{6-123}$$

式中，H 为反应器内液柱高度。

当反应器内装有蛇管时，则有：

$$\frac{\alpha d_t}{\lambda}=0.17\left(\frac{dn\rho}{\mu}\right)^{0.67}\left(\frac{c_P\mu}{\lambda}\right)^{0.37}\left(\frac{d}{D}\right)^{0.1}\left(\frac{d_t}{D}\right)^{0.15}$$

式中，d_t 为蛇管的直径。

对各种反应器系统，还有其他一些关联式。

例 6-1　维生素 C 制造中的古龙酸制备过程的单台塔式反应器的容量为 $200m^3$，装料系数为 70%，发酵热为 $16700kJ \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$，发酵温度为 30℃，冷却水的进、出口温度分别是 15℃ 和 23℃，设总传热系数为 $560W \cdot m^{-2}$，试计算反应器的总传热面积。

解　反应器有效体积　　　$V_R=70\% \times 200=140m^3$

反应器的热负荷 $Q=Q_E V_R=16700\times10^3\times140/3600=6.49\times10^5 W$

发酵温度 $T_b=30$℃，冷却水的进、出口温度分别是 $T_i=15$℃，$T_o=23$℃，则平均温差：

$$\Delta T_m=\frac{(T_b-T_i)-(T_b-T_o)}{\ln\dfrac{T_b-T_i}{T_b-T}}=10.5℃$$

已知总传热系数 $h_W=560W \cdot m^{-2}$，故总传热面积（A）为

$$A=\frac{Q}{h_W \Delta T_m}=110m^2$$

本章小结

生物反应体系的流变特性直接影响了生物反应体系的各种特性，是其他各节的基础；生物反应体系中的流体流动模型、搅拌与混合特征、气－液传质动力学与体积传质系数的测定、热量传递等基本理论和方程帮助我们了解这个特殊体系在质量、能量、动量传递方面的特性，这些特性是研究生物体系变化和进行工业设计的基础。在学习本章的基础上，读者可以阅读模型建立方面的相关书籍，并尝试建立合理的模型以模拟整个反应体系物质和热量传递和变化的实际情况。

参考文献

陈洪章. 2003. 生物过程工程与设备. 北京：化学工业出版社
郝惠娣，伍星，孙吉兴. 2003. 西北大学学报，33（5）：558～559
何建勇. 2009. 发酵工艺学. 第2版. 北京：中国医药科技出版社
李玉英. 2009. 发酵工程. 北京：中国农业大学出版社
欧阳平凯，陆永明. 1991. 化学反应工程与工艺，7（1）：60～67
戚以政，夏杰. 2004. 生物反应工程. 北京：化学工业出版社
史仲平，潘丰. 2010. 发酵过程解析、控制与检测技术. 第2版. 北京：化学工业出版社
杨友麟，项曙光. 2006. 化工过程模拟与优化. 北京：化学工业出版社
尹晔东，王运东，费维扬. 2000. 石化技术，7（3）：166～169
张建文，杨振亚，张正. 2009. 流体流动与传热过程的数值模拟基础与应用. 北京：化学工业出版社
张元兴，许学书. 2001. 生物反应器工程. 上海：华东理工大学出版社
郑津洋，董其伍，桑芝富. 2001. 过程设备设计. 北京：化学工业出版社
Fang A, Decker E L, Gorr G, Schween G, Reski R, Cell Biology Morphgenesis. 2002, 20：1135～1140
Jens N. 2002. Bioreaction Engineering Principles. 2nd ed. London：Kluwer Academic/Plenum publishers

习　　题

1. 常见发酵液的流变类型有哪些，各有什么特征？哪些因素对其产生影响？

2. 一反应器中脉冲示踪法得到的出口示踪剂浓度变化如下：

t（min^{-1}）	0	10	20	30	40	50	60	70	80
c（$kg\cdot m^{-3}$）	0	3	6	5	4	3	2	1	0

已知反应器有效容积 $1.5m^3$，液体流量为 $1.8m^3\cdot h^{-1}$，求其 $F(t)$、$E(t)$、$\bar{t}$ 和 σ_t^2，并试用无量纲值 θ 表示它们。

3. 在习题2的反应器中进行 A D 的酶反应，已知 $c_{A_0}=23mol\cdot m^{-3}$，动力学方程为 $-r_A=0.055c_{A0}$，请分别用凝集流、多级混合槽、平推流、全混流模型计算出口物料中 A 组分的转化率。

4. 若习题 3 采用轴向扩散模型，计算其 Pe 值与出口物料中 A 组分的转化率。
5. $F(\theta)$ 和 $E(\theta)$ 为某流动反应器的停留时间分布情况。
（1）若反应器为 PFR，试求 $F(1)$、$E(1)$、$F(0.7)$、$E(0.7)$、$E(1.2)$；
（2）若反应器为 CSTR，试求 $F(1)$、$E(1)$、$F(0.7)$、$E(0.7)$、$E(1.2)$；
（3）若反应器为非理想流动反应器，试求 $F(0)$、$E(0)$、$F(\infty)$、$E(\infty)$。
6. 试推导层流流动系统的 $F(t)$、$E(t)$。
7. 为什么解决好氧传递问题是好氧发酵过程设计的关键？简述氧传递过程的特征。
8. 氧传递的 k_L 测定方法有哪几种，简述各方法的基本原理。
9. 提高好氧发酵中氧传递速率的最好的方法是否为提高搅拌，怎样做更为有效？

第 7 章　生物反应器工程

【重要概念】

生物反应器、机械搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、膜生物反应器、管式生物反应器、生物传感器、生物反应器放大

引言

一般的生物反应过程可用图 7-1 所示的流程示意图表示。生物反应过程由 4 个部分组成：①原材料的预处理。包括原材料的选择，必要的物理与化学方法加工，培养基的配制和灭菌等。②生物催化剂的制备。包括菌种的选择、扩大培养和接种，酶催化反应中酶的纯化和固定化等。③生物反应器及反应条件的选择与监控。生物反应器是进行生化反应的核心设备。它应为细胞或酶提供适宜的反应环境以达到细胞生长和进行反应的目的。反应器的结构、操作方式和操作条件与反应原料的转化率、产品的质量和生产成本有着密切的关系。④产物的分离纯化。其目的是用适当的方法和手段将含量甚少的目的产物从反应液中提取出来并加以精制以达到规定的质量要求。生物反应器是整个生物反应过程的核心。

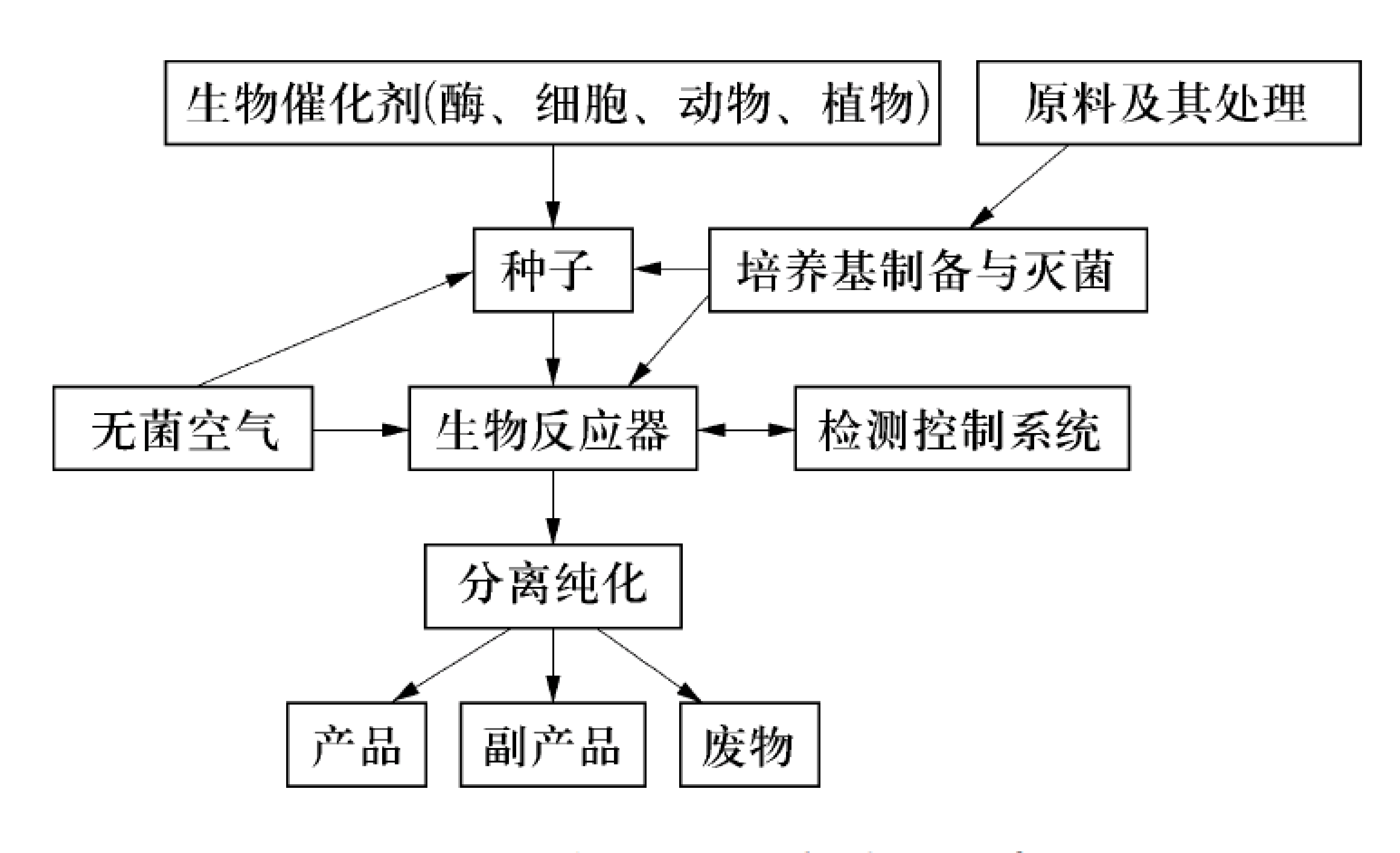


图 7-1　一般生物反应过程示意图

生物反应器是生物反应工程的核心设备，其结构的合理性直接决定反应器生物加工的效率。生物反应器的研究一直是生物反应工程的核心问题之一。随着青霉素的工业化生产，机械搅拌式生物反应器应运而生。此后，随着动、植物细胞培养、高等真菌培养、藻类培养等生物过程的发展，人们相应开发了大量的生物反应器，包括机械搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、膜生物反应器和管式生物反应器等。作为生物工程的一个重要分支学科，生物反应器工程主要研究生物反应器中的各类生物反应及生物加工过程

(包括微生物发酵、动物和植物细胞和组织培养工程、生物催化与生物转化等）的特征与本质，过程优化和放大对生物反应器系统设计、操作和控制的要求，致力于研究并揭示生物反应器的设计放大规律、满足过程需要的生物反应器系统强化、优化策略，使有关生物过程能迅速而有效地从实验室过渡到生产规模，或提高现有生产过程的生产效率。因此，生物反应器工程在生物技术产业化中发挥着不可替代的重要作用，是现代生物技术实现产业化的一个关键环节。

7.1　生物反应器的概念、分类与设计基础

7.1.1　生物反应器的概念

生物反应器是利用生物催化剂进行生物技术产品生产的反应装置，是生物反应过程的主要设备，在生物反应过程中发挥中心的作用，是实现生物技术产品产业化的关键设备，也是连接原料和产品的桥梁。一个良好的生物反应器应具备严密的结构、良好的流体混合性能与高效的传质和传热性能、可靠的检测与控制系统。判断生物反应器性能好坏的主要标准是：该装置是否能满足生物反应的要求，是否能取得最大的生产效率。

7.1.2　生物反应器的分类

生物反应器有多种型号，可从多个角度进行分类。

（1）根据反应器的结构特征，可将其分为槽式、管式、塔式和膜式等类型，它们之间的主要差别反映在其外形（长径比）和内部结构上的不同。槽式反应器高径比较小（一般为 1 ~ 3)；管式反应器长径比较大（一般 >30)；塔式反应器的高径比介于槽式和管式之间；膜式反应器一般是在其他形式的反应器中装有膜组件，或起固定化生物催化剂的作用，或起分离作用。

（2）根据反应器的操作方式不同，可将其分为分批式（间歇式）操作、连续式和半分批式操作反应器。分批操作又称为间歇操作，采用此种操作方式的反应器又称为间歇反应器。以酶为催化剂的间歇操作式反应器，在反应开始到反应结束的整个反应过程中，无底物和产物的加入与输出。反应过程中，底物浓度、产物浓度均只随反应时间而变化。以细胞为催化剂的间歇反应器，则在加入反应基质后，进行灭菌（或在灭过菌的反应器中加入经过灭菌的培养基)，接种，维持一定的反应条件进行反应。接种后，除了好氧反应需要在反应过程中通入无菌空气、消除泡沫所用的消泡剂以及维持一定 pH 所用酸、碱之外，反应过程中不再加入反应基质，也不输出产物，只有待反应进行到规定的程度后，才将全部发酵液放出，进行后处理。反应器经过清洗、灭菌后，重新加入培养基，继续进行反应，在此反应过程中，基质浓度、产物浓度及细胞密度均随反应进行的时间而变化，尤其是细胞本身将经历不同的生长阶段，显示出不同的催化活力。间歇操作反应器的基本特征是：反应物料一次加入一次卸出；反应器物系的组成仅随时间而变化。因此，它属于非稳态过程。由于间歇式反应器适合于多品种、小批量、反应速率较慢的反应过程，又可以经常进行灭菌操作，因此它在生物反应器中占有重要地位。

采用连续操作的反应器叫做连续式反应器，这一操作方式的特点是原料连续输入反应器，反应产物则连续地从反应器中流出。反应器内任何部位的物系组成均不随时间而变，所

以连续操作反应器多属于稳态操作。特别是它可以克服在进行间歇操作时，细胞反应所存在的由于营养基质耗尽或有害代谢产物积累所造成的反应只能在一定有限的时间内进行的缺点。连续操作指向反应器内以一定流量不断加入新的基质，同时以相同流量不断取出反应液，这样就可以不断补充细胞需要的营养物质，而有害代谢产物则不断被稀释而排出，生物反应可以连续稳定地进行下去。但是连续操作一般易发生杂菌污染，而且操作时间过长，细胞又易退化变异。

半间歇、半连续操作指原料与产物只有其中的一种为连续输入或输出，而其余则为分批加入或输出的操作，相应的反应器称为半间歇式反应器或半连续反应器。半间歇操作是一种同时兼有间歇操作和连续操作某些特点的操作。半间歇操作对生物反应有着特别重要的意义。例如存在有基质抑制的细胞反应，当基质浓度过高时会对细胞的生长产生抑制作用，若利用半间歇半连续操作，则可使基质浓度处在较低的水平，以解除其抑制作用。对细胞反应，此种半间歇、半连续操作又常称为补料分批培养，或称流加操作技术。在此种操作过程中，由于加料，反应液体积逐渐加大，到一定时间将反应液从反应器中放出。如果只取出部分反应液，剩下的反应液继续进行补料培养，反复多次进行放料和补料操作，此种方法又称重复补料或重复流加操作。

（3）根据反应器内物料混合方式和混合状态的不同进行分类。根据物料混合方式的不同，可将其分为机械搅拌式、气体搅拌式和液体环流式反应器。机械搅拌式反应器通过采用机械搅拌实现反应体系的混合；气体搅拌式反应器则以压缩空气作为动力实现反应体系的混合；液体环流式反应器则通过外部的液体循环泵实现反应体系的混合。对生物反应器的另外一种重要的分类方法是根据反应物系在反应器内的流动和混合状态来进行的，常以反应器内流体的流动类型表示。对不同流型的反应器，反应器内各组分的浓度等状态参数的分布各不相同，而流动类型又是决定反应进行状况的重要工程因素。对连续操作的反应器，物料的混合状况表示了物料在反应器内停留时间的分布状况，常将这种具有不同停留时间的物料之间的混合称为返混，以区别于通常所说的混合。当反应器内完全不存在物料粒子之间的返混时，这种流动称为活塞流，该反应器称为活塞流反应器；当反应器内不同粒子之间存在着最大返混时，流体的流动称为全混流，该反应器称为全混流反应器。显然，活塞流与全混流是反应器内返混情况的两个极端，一个是完全不存在返混，一个是返混达到最大，因此在上述两种假设流动状况下所建立的反应器模型称为理想流动模型；而在实际的生物反应器内流体的返混往往介于上述两种极端情况之间，因而称为非理想流动模型。因此按流动模型来分，可分为理想反应器与非理想反应器；理想反应器又可分为活塞流和全混流反应器。对生物反应器进行这种分类有利于对反应器进行模拟与放大。

（4）根据反应器内反应物系的相态不同，可将其分为均相反应器和非均相反应器。非均相反应器中又分为气液相、液固相和气液固三相等多相反应器。对生化反应，真正的均相反应是可溶的酶催化反应；对于细胞反应，虽有细胞团块存在，但有时也可按拟均相处理。确定其是均相还是非均相，主要看是否存在传递因素的影响。

（5）根据所采用的生物催化剂的不同，常将生物反应器分为酶反应器和细胞反应器两大类。在生物反应器中，若仅是利用游离或固定化酶进行酶催化反应过程，则此种反应器常被称为酶催化反应器。由于酶催化反应器中所进行的生物反应比较简单，因而酶反应器与一般的化学反应器并无多大的区别。此类反应器的主要特点是反应条件温和，通常在常温、常压下进行。图 7-2 所示为各类酶反应器的示意图。若为游离酶，常用的为搅拌槽式反应器，

可分批式或半分批式操作。此类反应器结构简单，适于小规模生产，但不能进行酶的回收和利用。亦可采用带有膜组件的超滤膜反应器，由于膜具有选择透过性，只允许小分子产物透过，而酶则被截留回收，重新使用。它特别适合于产物对酶有抑制作用的反应体系。但存在酶的吸附损失或在膜表面浓缩极化现象，长期操作时酶的稳定性差。若为固定化酶，采用较多的是固定床和流化床反应器。固定床是一种单位体积催化剂负载量多、反应效率高的反应器，但其床层压力降较大、传质和传热效率较低，不适合于含有颗粒或黏度很大的底物溶液。流化床则为一种装有较小固定化酶颗粒的塔式反应器。底物以足够大的流速使颗粒处于流化状态，它具有良好的传质、传热性能，适于处理黏度高的底物，但它易使固定化酶颗粒破损，操作成本较高。还可采用由膜状或板状固定化酶组装成的膜型反应器。

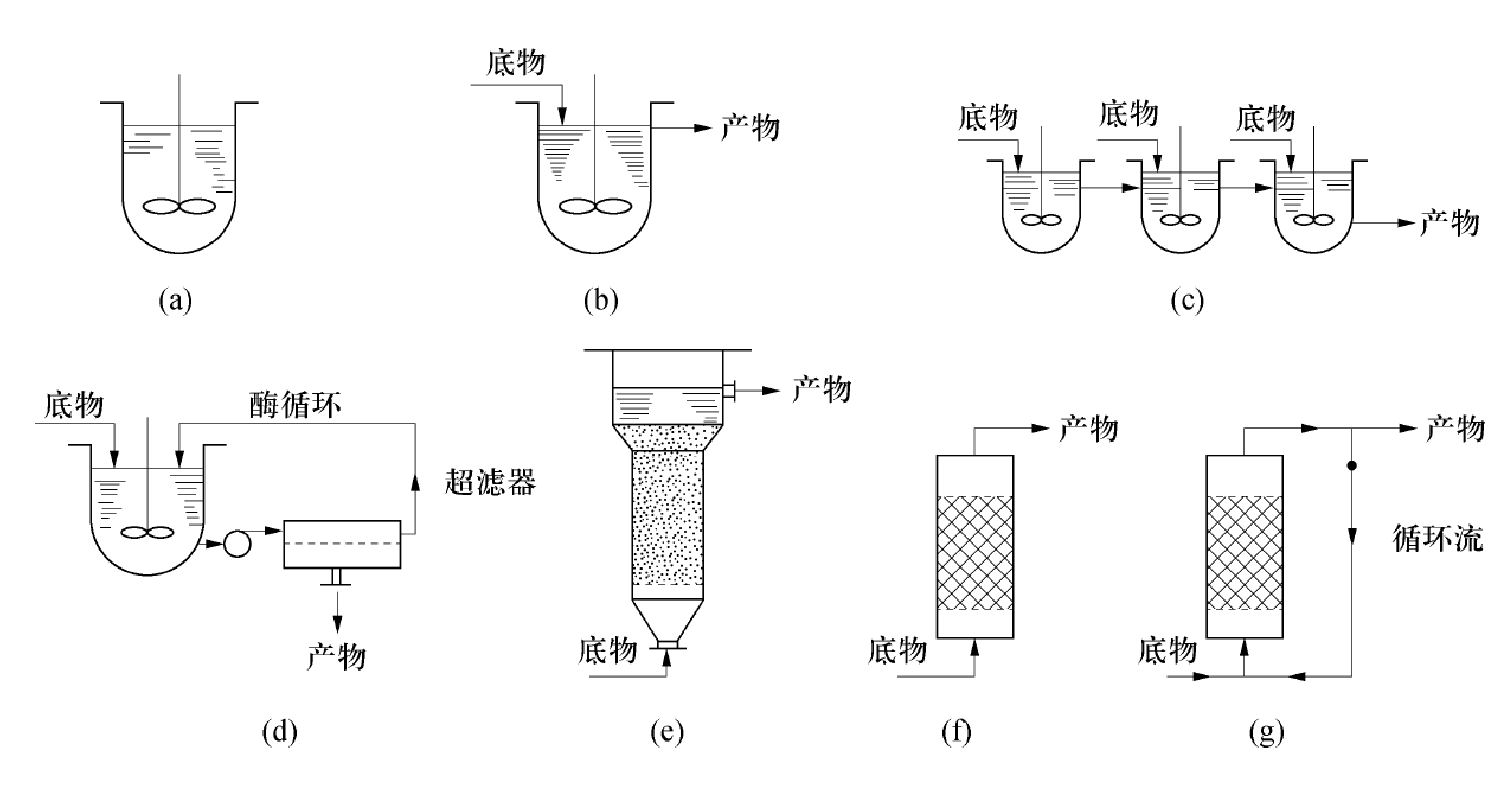


图 7-2　酶反应器及操作方式示意图

（a）间歇式搅拌罐；（b）连续式搅拌罐；（c）多罐串联半连续操作；
（d）搅拌罐 - 超滤器联合装置；（e）流化床；（f）固定床；（g）带循环的固定床

若在生物反应过程中，伴随有活细胞（包括微生物细胞、动物细胞、植物细胞）的生长和代谢，它是典型的自催化反应过程，细胞既是生物反应的催化剂，又是反应的主要产物之一，此种反应器称为细胞生物反应器。根据细胞类型的不同，细胞反应器又可分为微生物细胞反应器（如机械搅拌槽式反应器）、动物细胞反应器（如微载体悬浮培养反应器）和植物细胞反应器（如光照生物反应器）。若根据细胞反应是否需氧来考虑，细胞反应器又有厌氧反应器和好氧反应器之分。若根据细胞反应时底物（基质）的相态，细胞反应又可分为液态发酵和固态发酵，相应的生物反应器则可称为液态生物反应器和固态生物反应器。与酶催化反应器不同，细胞反应器中反应过程复杂，它是通过细胞中精确调控的酶系进行催化的，并经一系列的生物反应将培养基组分转化为细胞的组成以及各种代谢产物。对细胞生物反应器，应用较多的有机械搅拌的槽式反应器、气体搅拌的鼓泡塔和气升式反应器、适用于固定化细胞的固定床反应器、滴流床反应器和流化床反应器、膜式反应器以及固态发酵反应器和适用于动物与植物细胞培养的特殊生物反应器等。图 7-3 为各种细胞生物反应器的示意图。

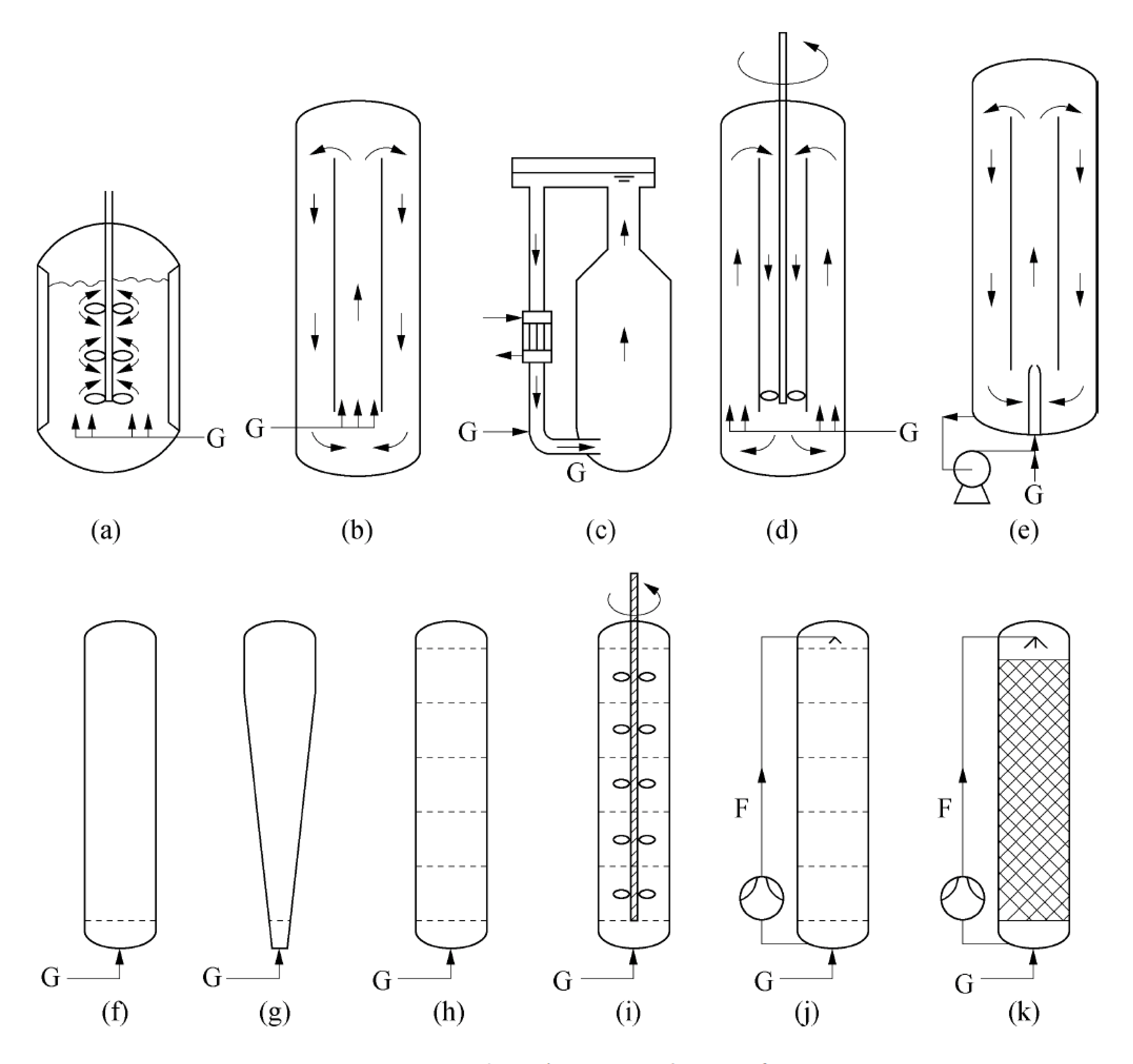


图 7-3 几种细胞生物反应器示意图

（a）通用式；（b）气升式；（c）压力循环式；（d）搅拌环流式；（e）喷射环流；（f）鼓泡塔；（g）锥形鼓泡塔；（h）多级筛板的鼓泡塔；（i）多级搅拌塔；（j）泵循环多级筛板的鼓泡塔；（k）泵循环填充床

G：气体；F：培养液

7.1.3 生物反应器的设计基础

生物反应器是生物技术工艺的中心环节，对生物反应器的选择与设计是生化工程尤其是生物反应工程的中心问题。在基本上了解了生化反应的特点，特别是它的优缺点之后，生物反应器设计者就要进行反应器的设计以充分发挥生化反应的优点，并从生化工程的角度来克服一些限制因素，以利于最大限度地得到成本最低、产量及质量最高的产品，因此，在进行生物反应器设计时，必须满足下述要求：

（1）生物因素。必须有很好的生物相容性，能较好地模拟细胞的体内生长环境。

（2）化学因素。必须提供足够的时间，达到所需的反应程度，符合过程反应动力学的要求。

（3）传质因素。对非均相反应，反应过程常被反应底物的扩散速率所制约，因此必须尽量满足物质传递的要求。

（4）传热因素。应有能力移除或加入过程的热量，无过热点存在。

（5）安全因素。有害反应物和产物能够实现隔离，有优良的防污染能力。

（6）操作因素。便于操作和维修。

生物反应器的主要设计内容如下：①选择合适的反应器类型，根据反应及物料的特性和生产工艺特征，确定反应器的操作方式、结构类型、传递和流动方式等；②确定最佳操作条

件及其控制方式，如温度、压力、pH、通气量、物料流量等；③计算出所需反应器体积，设计各种结构参数等。

反应体积的确定是反应器设计的核心内容。在反应器型号和操作条件已定的情况下来确定反应器体积，这取决于反应器内反应组分的转化速率，而转化速率又取决于反应物系的组成和操作条件。一般设计反应器时要使用物料衡算式、热平衡式、反应动力学公式和与流体流动特性有关的式子等，但基本原理都是基于反应系统中各成分适用的质量守恒定律。无论何种封闭系统（或领域），物料平衡总是适用的。如果某一系统是反应器整体，那么称为总物料平衡；与其对应，关于微小流体的物料平衡称为微分物料平衡。这种概念可用于体积单元中，适用于各种形式的生物反应器的设计。

反应器设计的基本方程有 3 类：①描述浓度变化的物料衡算式；②描述温度变化的能量衡算式，或称为能量方程；③描述压力变化的动量衡算式。建立这三类方程的依据分别是质量守恒定律、能量守恒定律和动量守恒定律。应用上述三大定律来建立基本方程之前，首先需要确定变量，其次是确定控制体积。变量分因变量和自变量两种。在反应器设计和分析中，建立物料衡算式时通常以反应组分的浓度或某组分的转化率作为因变量；能量衡算式和动量衡算式则分别以反应物系的温度和压力做因变量。对于自变量，有时间自变量和空间自变量两种。对于稳态过程，由于因变量与时间无关，因此在建立衡算式时就不须考虑时间变量，非稳态过程则两种自变量均要考虑。考虑空间自变量时，一般只限于一维——以反应器的轴向距离为空间自变量。所谓控制体积是指建立衡算式的空间范围，即在多大的空间范围内进行衡算。其选择原则是以能把反应速率视为定值的最大空间范围作为控制体积。

（1）物料衡算方程：物料衡算的基础是质量守恒定律，根据这一定律可以对任一封闭体系进行物料衡算。对生化反应，衡算的组分可选择底物和产物，也可以进行细胞的衡算。衡算的时间基准，可取某一段时间或某一瞬时的微分时间。衡算的空间范围可对一微元体积或对整个反应系统进行衡算，前者称为微分物料衡算，后者称为总物料衡算。对反应基质和产物进行物料衡算，其基本关系式为：

$$\begin{pmatrix}\text{组分进入该体}\\\text{积单元的量}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}\text{组分流出该体}\\\text{积单元的量}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{体积单元内}\\\text{组分转化量}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{体积单元内}\\\text{组分累积量}\end{pmatrix}\tag{7-1}$$

上式是对反应物（底物和基质）而言；若对产物，则等号右边第二项应改为组分生成量，并应取负值。

若对细胞进行物料衡算，则有：

$$\begin{pmatrix}\text{细胞进入该体}\\\text{积单元的量}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}\text{细胞流出该体}\\\text{积单元的量}\end{pmatrix}-\begin{pmatrix}\text{体积单元内}\\\text{细胞生长量}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{体积单元内}\\\text{细胞死亡量}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{体积单元内}\\\text{细胞累积量}\end{pmatrix}\tag{7-2}$$

在稳态时，即所有状态参数均不随时间而变化时，上述衡算式中累积项均为零。

（2）能量衡算方程：对大多数反应器，一般对能量衡算式只做热量衡算，此时称为热量衡算式。在一定的时间范围内，可表示为：

$$\begin{pmatrix}\text{单位时间内}\\\text{输入的热量}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}\text{单位时间内}\\\text{输出的热量}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{单位时间内}\\\text{的反应热}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}\text{单位时间内}\\\text{累积的热量}\end{pmatrix}\tag{7-3}$$

如果反应为放热反应，则等号右边第二项取负号；如果为吸热反应，则应取正号。

对于动量衡算，由于生物反应器一般可做恒压处理，因此动量衡算式可略去。

生物反应器设计的目标是要获得最高的体积产率和产物得率。

1. 生物反应器的体积产率（Q_P） 如何使一个生物反应器能有最高的体积产率 Q_P（即每小时每升反应体积能生产的产品质量，$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）呢？现以 Cooney 图解来看（图 7-4），纵坐标表示产率 Q_P，横坐标表示催化剂浓度 c_X（即每升反应体积的催化剂质量），也即生物反应器中的细胞浓度或酶浓度。产率随着催化剂浓度 c_X 及比活力 S_a（即酶或细胞的催化效率）的增加而增加。垂直虚线为催化剂浓度的最大值。水平虚线表示产率的最高限度。它是基础产物合成时质与热的传递的结果。

当一个微生物或生物催化剂的比活力 S_a 得到提高，就意味着用较少量的催化剂可得到较大的产率 Q_P，催化剂成本就会下降，这是生物化学家的一个研究任务。而工程设计的改进以利于热及质的转移可提高最大产率的限度，这是生化工程学家的一个研究任务。

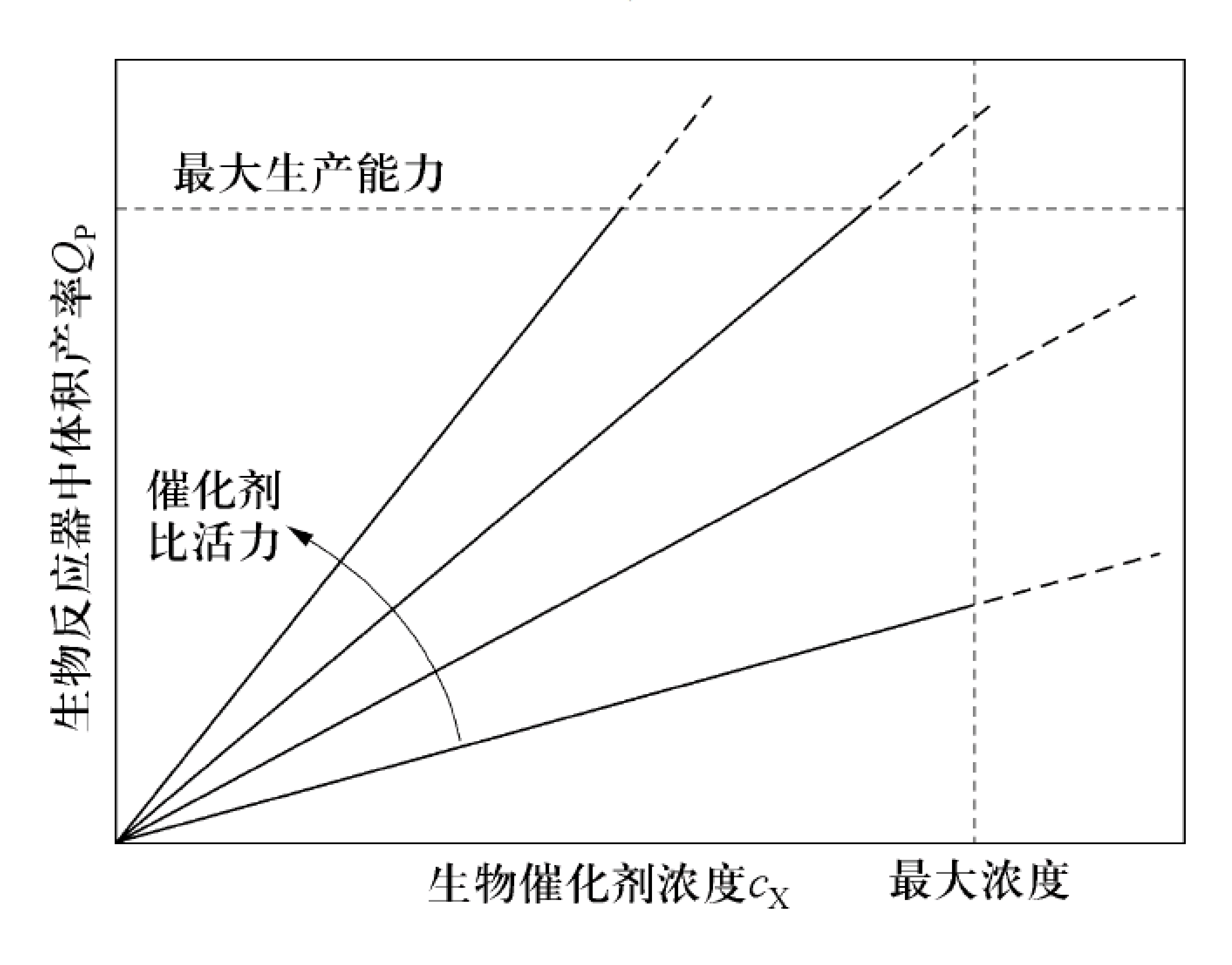


图 7-4 生物反应器中体积产率 Q_P 与催化剂浓度 c_X 之间的关系

2. 生物反应器的产物得率（$R_{P/X}$） 上面从原则上讨论了如何使一个生物反应器能有最高的体积产率 Q_P，现在的问题是如何克服限制因素？首先，在设计生物反应器时要考虑的是如何利用最少的原料得到最多的产物，也就是由原料到产品的转化率 $Y_{P/S}$（每克底物能得到的产品克数）的提高。当然，还要考虑到催化剂作用的选择性或者对底物作用的特异性，以保证将副产品的产生降到最低限度，因为副产品的存在将严重影响产品的回收率及质量。另外，产品的最大转化率还受反应热力学的控制。而实际的产率则常常受到生物转化的机制及合成生物催化剂的必需条件影响。

$$R_{P/X} = Y_{P/S}\int_0^{t_e} S_a(t)\,dt \tag{7-4}$$

式中：$R_{P/X}$为产物对催化剂的得率，即每克催化剂所能生产的产品质量（$g \cdot g^{-1}$）；$Y_{P/S}$为产物对底物的得率，即每克底物所能得到的产品质量（$g \cdot g^{-1}$）；S_a（t）为比活力，即每单位时间内每克细胞或酶所能作用的底物质量（$g \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$），它表示催化剂的催化效率；$t_e$ 为催化剂的有效时间，一般以半衰期表示。

生物反应器的最终目标是设法得到最大的 $R_{P/X}$值，不同的反应，可能 $R_{P/X}$值相差很大。如以固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆为例，$R_{P/X} > 2500$，即每克酶制品可生产 2500g 以上高果糖浆；而对单细胞蛋白或乙醇来说，则 $R_{P/X}$值几乎为 1 ~ 10，特殊的医药产品如青霉素的 $R_{P/X}$值则为 1。

在酶促生物反应中，提高酶的比活力 S_a 和稳定性 t_e 以及提高细胞的产酶率，均可改进

$R_{P/X}$值。在微生物发酵反应中，则可控制用于细胞生长、产物及副产品的合成及维持细胞代谢的原料需用量来提高 $Y_{P/S}$值，以提高 $R_{P/X}$值。这些皆可通过遗传工程的手段和改进反应条件及通过细胞的循环使用或固定化技术来解决。也就是说，$R_{P/X}$的最大值可通过生化工程手段来提高比活力、选择性及有效催化时间来实现。

产物的浓度是一个影响分离提纯，即回收成本高低的关键问题。在连续工艺中，产物浓度 c_P 与操作条件的关系如下：

$$c_P = \frac{S_a V c_X}{F} = \frac{S_a c_X}{D} \tag{7-5}$$

式中：c_P 为产物浓度（$g \cdot L^{-1}$）；S_a 为比活力（$g \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$）；$V$ 为反应器体积（L）；c_X 为催化剂浓度（$g \cdot L^{-1}$）；F 为反应液流速（$L \cdot s^{-1}$）；D 为稀释率（s^{-1}）。

由式（7-5）可知，降低流速或增加催化剂的浓度或比活力，都可以提高产物的浓度。传统的以微生物活细胞为催化剂的发酵工艺，如抗生素、氨基酸及有机酸的发酵，就是以分批发酵或补料分批发酵进行的，因为分批发酵过程中的流速 $F=0$，故可得到最大的产物浓度，而连续发酵工艺中的产率较高而产物浓度则较低。就提高酶浓度来说，固定化技术是一个最好的方法，它可超越高蛋白溶液的限制使反应器中催化剂浓度大大增加，而且可反复使用多次，又易与产物分离。所以，各种类型的固定化生物催化剂的生物反应器必将日益得到发展。

7.2　机械搅拌式生物反应器

机械搅拌槽式反应器是生物反应过程中应用最多的一类反应器，医药工业第一个大规模的微生物发酵过程——青霉素生产就是在机械搅拌槽式反应器中进行的。而且迄今为止，对新的生物反应过程，首选的生物反应器仍然是机械搅拌式反应器。机械搅拌槽式反应器能适用于大多数的生物反应过程，是形成标准化的通用产品。对于工厂来说，使用通用设备，对不同的微生物反应过程具有更大的灵活性。因此通常只有在机械搅拌槽式反应器的气液传递性能或剪切应力不能满足生物反应过程时才会考虑用其他类型的反应器。机械搅拌槽式反应器大多数用于间歇反应。该类反应器的主要特征是既有机械搅拌装置，又有通入压缩空气装置。其主要优点是操作弹性大，适应性强，pH 和温度易于控制，放大容易；主要缺点是内部结构复杂，制造费用高，运行能耗高，易造成杂菌污染，机械剪切应力大，易造成某些细胞，如丝状菌和动、植物细胞的损伤。对需氧量大、反应液黏度高，且呈非牛顿型流动特性的细胞反应过程，一般采用该类反应器。

7.2.1　结构特点及操作

机械搅拌槽式反应器的结构如图 7-5 所示。反应器外形为圆柱形，为承受灭菌时的蒸汽压力，盖和底的封头为椭圆形，中心轴位置上装有搅拌器。它的几何尺寸已趋于标准化。具体尺寸比例的范围为（各符号参看图 7-6）：H/D 为 1.7～3；d/D 为 1/2～1/3；W/D 为 1/8～1/12；B/D 为 0.8～1.0；S/d 为 1～2.5。

反应器的主要组成部分有壳体、机械搅拌系统（搅拌器、挡板、轴封、联轴器和中间轴承等）、通气系统（空气分布器）、温控系统、消泡系统、pH 控制系统等，并在壳体的适当位置设置排气、取样、接种、进料口、出料口以及人孔和视镜等部件。

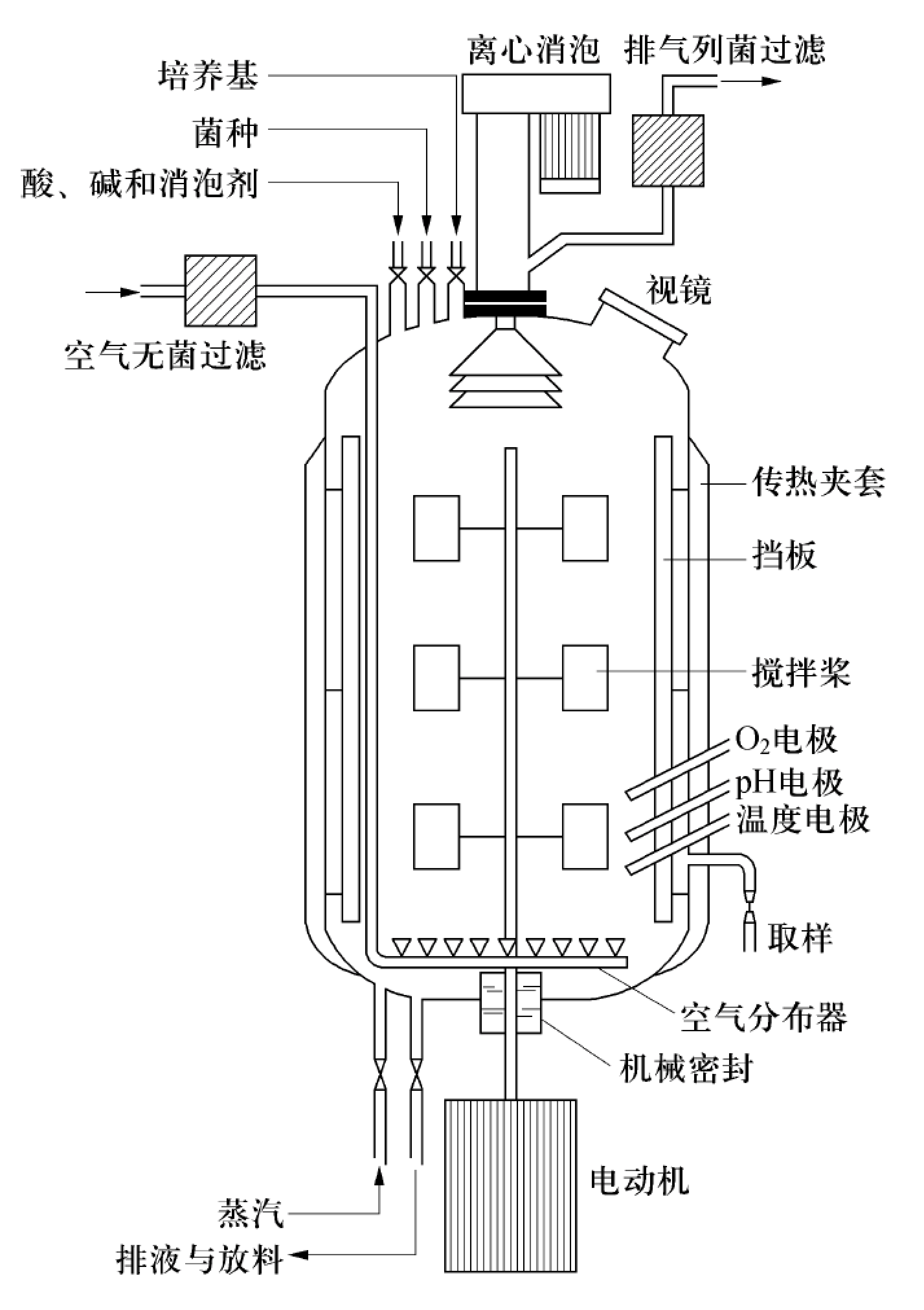



图 7-5　通用式机械搅拌槽式反应器示意图

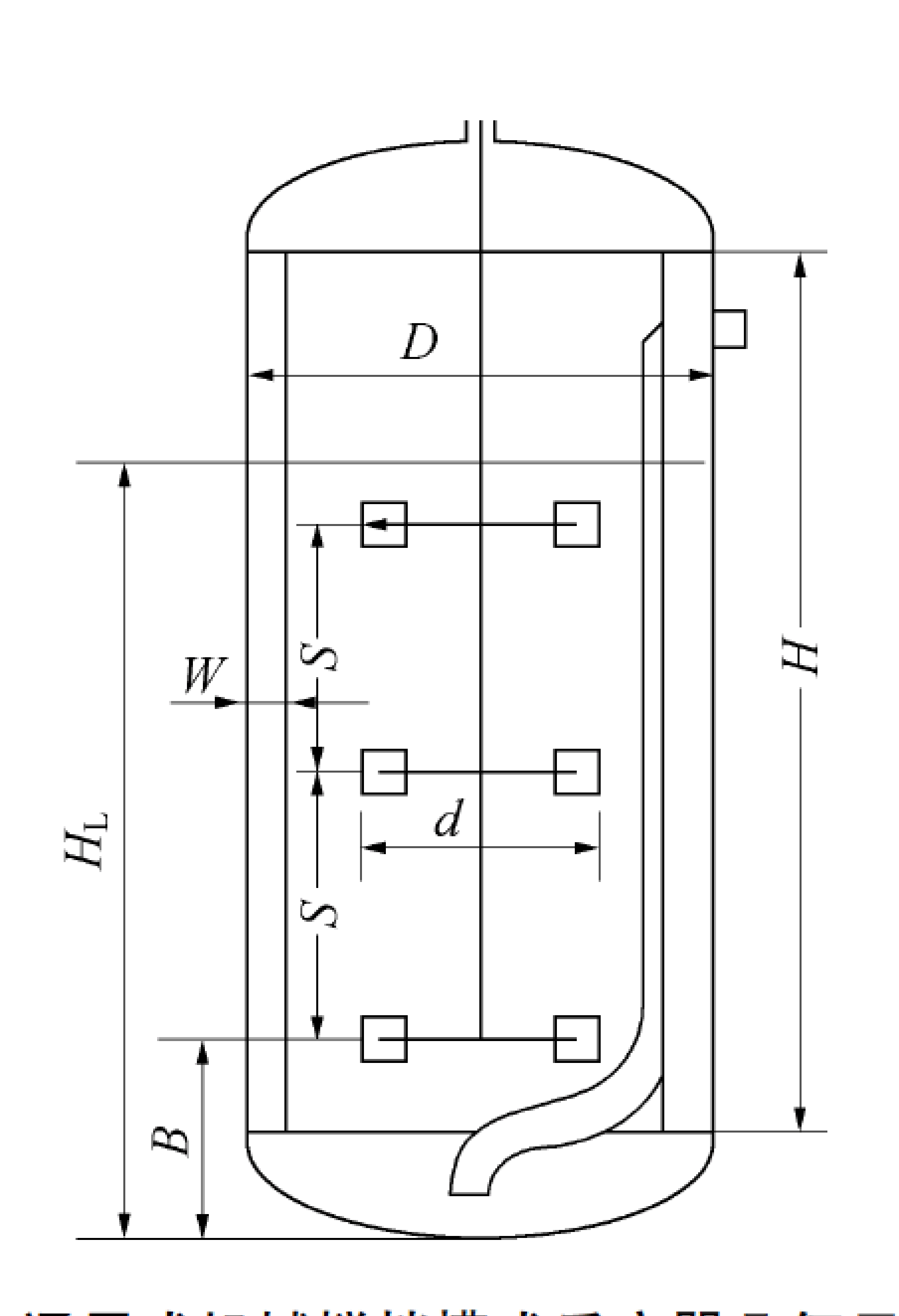


图 7-6　通用式机械搅拌槽式反应器几何尺寸比例

H：筒体高度（m）；*D*：反应器直径（m）；*W*：挡板高度（m）；*d*：搅拌器直径（m）；H_L：液位高度（m）；*S*：搅拌器的间距（m）；*B*：搅拌器距底部的间距（m）

（1）搅拌系统：主要由电机、变速箱、搅拌轴、搅拌桨、轴封和挡板组成。电极和变速箱置于罐体之外。对小型反应器，可以采用单相电驱动的电机，而大型反应器所用的一般均为三相电机。这是因为相同功率下后者的电流较小，因而发热量也相应降低。对大型反应器，由于电机的转速一般远高于搅拌转速，必须通过变速箱降低转速。实验室小型反应器可以采用无级变速，不需要变速箱。在间歇培养时，细胞生长各个阶段对剪切应力和氧传递有不同的要求，为了降低功耗，最好采用可调速电机。

搅拌轴既可以从顶部伸入罐体，也可以从底部伸入罐体，前者称为上搅拌，后者称为下搅拌。一般而言，上搅拌的制造和安装成本要略高于下搅拌。但是，采用下搅拌时，培养基中的固体颗粒或者可溶性成分在水分挥发后形成的结晶会损坏轴封，使其维护成本增加。不同尺寸的通气搅拌罐，其搅拌桨层数也不同，小型通气搅拌罐一般只有一层搅拌桨，而大型通气搅拌罐一般具有 2 ~4 层搅拌桨以改善混合和传质。

轴封的主要作用是防止环境中的微生物进入反应器。机械传动部件往往是造成染菌的主要原因之一，因此轴封设计的关键是避免染菌和泄漏，应尽可能采用无菌密封材料。

挡板的作用则是防止液面产生旋涡，改变液流方向，由径向流变为轴向流，促使流体翻动，增加传质与混合。通常要求达到“全挡板条件”。全挡板条件是指在一定的搅拌转速下，在搅拌槽反应器中再增加挡板时，搅拌功率不再增加，而漩涡基本消失。满足全挡板条

件的挡板数或宽度由式（7-6）确定：

$$\frac{W}{D}Z = 0.4 \tag{7-6}$$

式中：W 为挡板宽度（m）；D 为反应器直径（m）；Z 为挡板数量。

搅拌器的主要作用有：打碎气泡、增加气液接触面积；产生涡流，延长气泡在液体中的停留时间；造成湍流，减小气泡外滞留膜的厚度；将能量传递给液体，使其充分混合并使液体中的固相物料保持悬浮状态。根据搅拌所产生的流体运动的初始方向，可以将搅拌轴分为径向流搅拌轴和轴向流搅拌轴。径向流搅拌器将流体向外推进，使流体沿叶轮半径方向排出，当遇反应器内壁和挡板后再向上下两侧折返，产生次生流，即轴向流。轴向流搅拌器则使流体一开始就沿轴向运动。图 7-7 表示了机械搅拌反应器中的两种流体流动形态。一般而言，带轴向流搅拌器的反应器，其功率特征数较低，达到同样的混合效果所需消耗的能量远低于径向流搅拌桨。径向流搅拌桨所造成的剪切应力大于轴向流搅拌桨，这有利于打碎气泡，从而增大氧传递速率，但会对有些细胞产生伤害。因此，径向流搅拌桨多用于对剪切应力不敏感的好氧细菌和酵母的培养，而轴向流搅拌桨多用于对剪切应力敏感的生物反应体系。对于大型发酵罐，可采用这两种搅拌器混合配置的设计，以充分发挥各自的优点。最下层的桨一般采用平板桨，这种桨具有优良的气泡破碎效果，这是在青霉素发酵研究和开发中得到的经验，一直沿用至今。

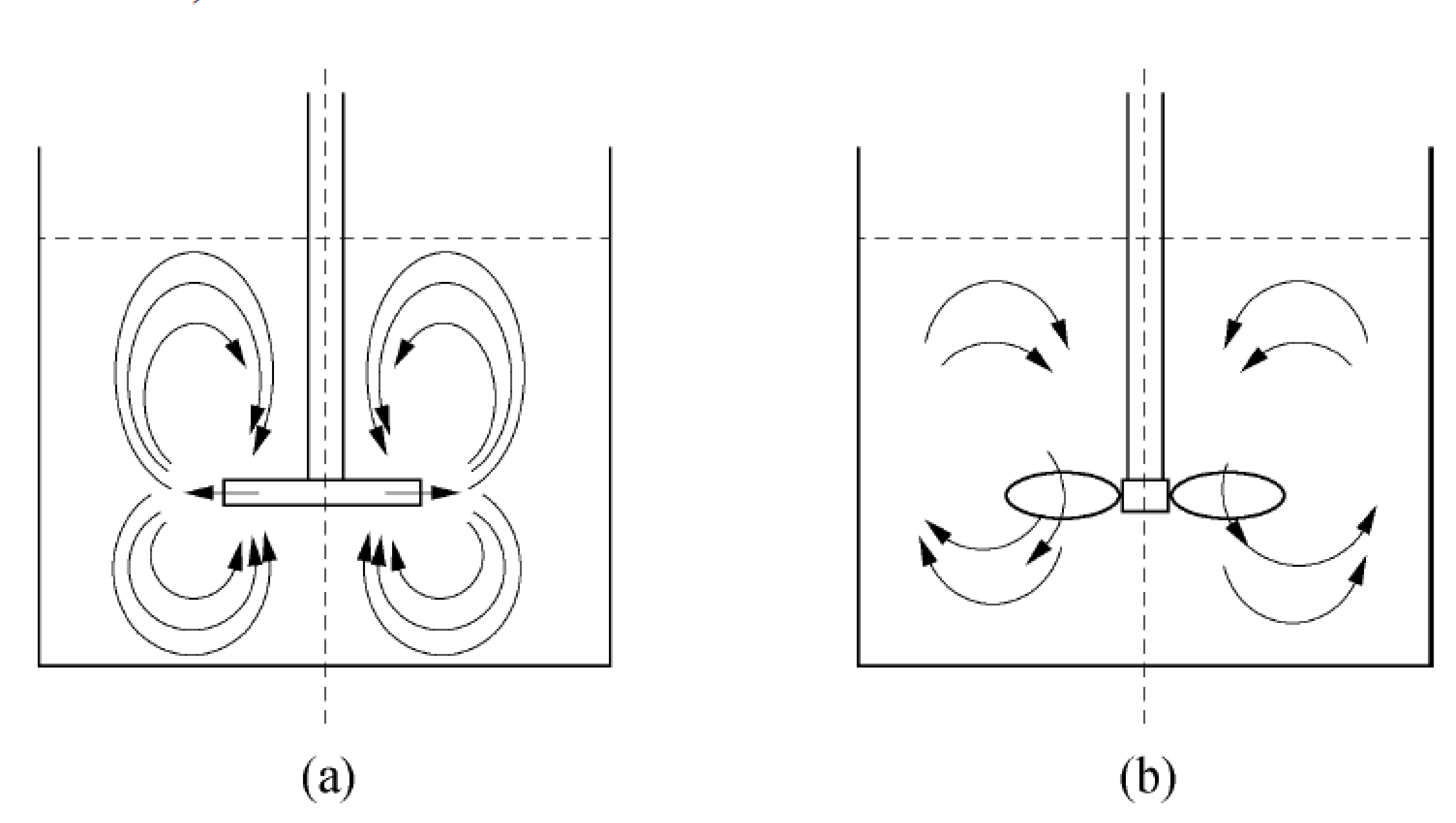


图 7-7　机械搅拌反应器中流动形态示意图

（a）径向流；（b）轴向流

径向流搅拌器中最典型的是涡轮式搅拌器。由于涡轮的叶片对液体施加一个径向离心力，导致液体从轴向流入后再从径向流出，并在反应器内循环。该类反应器的特点是对流体的剪切作用强烈，有利于气泡破碎以增大氧的传递速率，但其功率消耗大，作用范围小，且会对某些细胞产生伤害。由于该类搅拌器多用于对剪切应力不敏感的好氧细菌和酵母的培养过程。常用的涡轮式搅拌器有平叶式、弯叶式和箭叶式 3 种。

螺旋桨搅拌器则为一种以轴向流动为主的搅拌器。它将反应器内的液体向下或向上推进，形成轴向的螺旋运动。其特点是转数高，产生的循环量大，混合效果好，但其造成的剪切率较低，对细胞的分散效果差，适合于要求反应器内流体混合均匀、剪切性能温和的细胞反应过程。属于此类搅拌器的还有斜叶桨、螺带桨等。图 7-8 为几种典型的搅拌器示意图。

对大型生物反应器，常将涡轮式搅拌器和螺旋桨式搅拌器组合使用，既可利用涡轮式搅拌器强化小范围的涡流扩散，实现小范围的气液混合，又可利用螺旋桨式搅拌器强化主体对流扩散，实现大范围的气液混合。其组合方式是，下层选用涡轮搅拌器，上层选用螺旋桨式搅拌器，该组合形式可以提高传质系数，降低功率消耗，降低剪切应力。

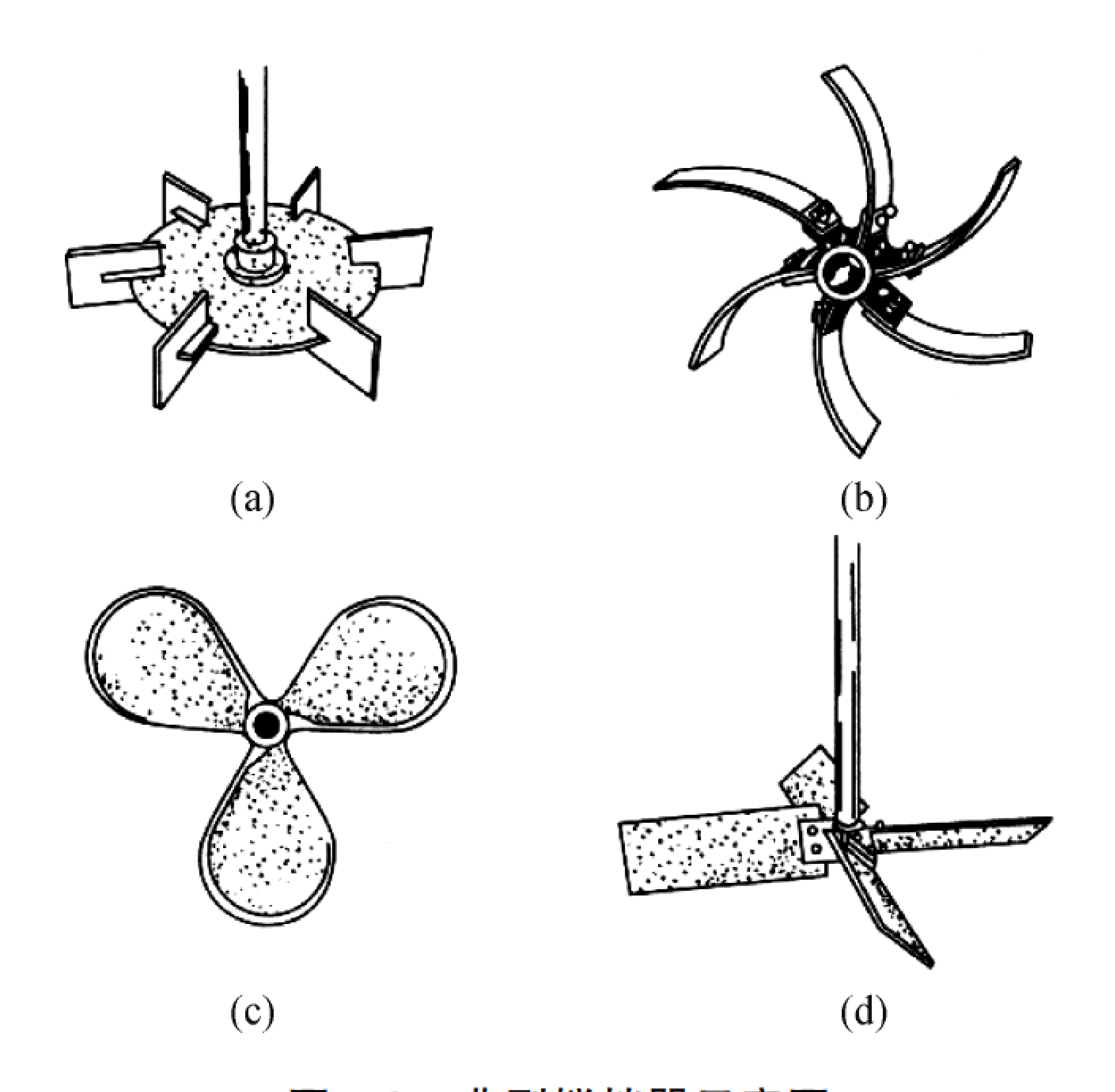


图 7-8　典型搅拌器示意图

（a）直叶涡轮（径）；（b）弯叶桨（径）；
（c）螺旋桨（轴）；（d）斜叶桨（轴）

若采用固定化酶或固定化细胞为催化剂时，或因催化剂用量大、颗粒小，或因所处理的底物为非水溶性的，或因反应物黏性很大，此时反应器常称为机械搅拌桨反应器。为了防止搅拌桨的剪切应力对催化剂的损伤和有利于黏性物料的混合，常采用框锚式和螺旋螺杆式搅拌桨，如图 7-9 所示。

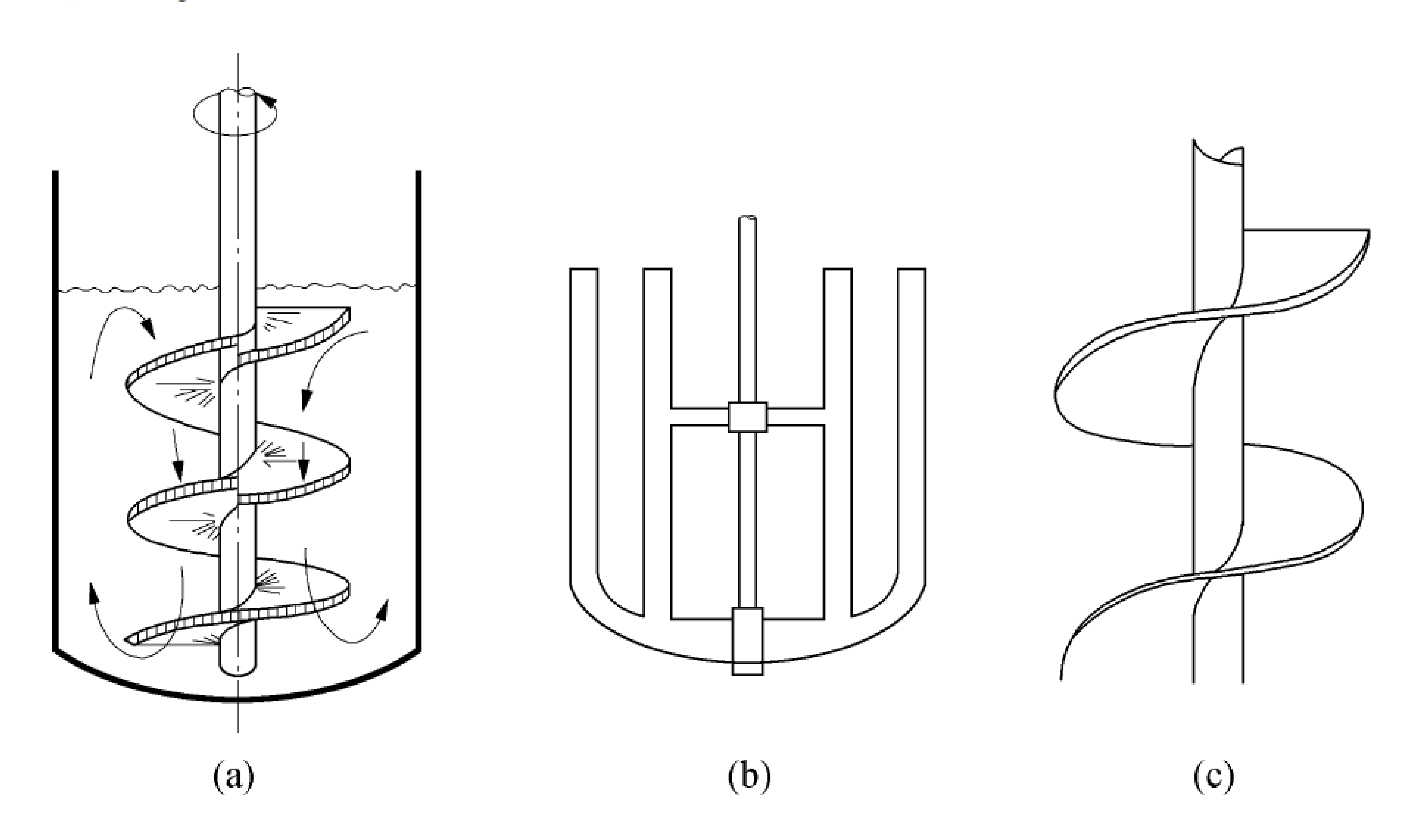


图 7-9　轴向流搅拌反应器和搅拌桨示意图

（a）反应器内流动模式；（b）框锚式搅拌桨；（c）螺旋螺杆式搅拌桨

（2）通气系统：好氧过程中，气体分布器置于反应器底部最底层搅拌桨叶的下面。气体分布器有带孔的平板、带孔的盘管或只是一根单管，为防止堵塞，一般孔口朝下。气体通过气体分布器从底部通入，自由上升，直至碰到搅拌器底盘，与液体混合，在离心力的作用下，从中心向反应器壁发生径向运动，并在此过程中发生分散。反应器还装配了出口气体冷凝和过滤装置。出口气体进行冷凝可避免反应液中水分的过度蒸发；过滤既可防止外界杂菌通过空气出口进入反应器内，也可避免反应器中菌株扩散到环境中去。

（3）温控系统：由于细胞反应和机械搅拌都是放热过程，因此多数生物反应系统在运

行期间需要冷却。对小于 5m^3 的小型通气搅拌槽式反应器，多采用外部夹套作为换热装置，其优点是结构简单，加工容易，反应器内无冷却装置，死角少，容易进行清洗和灭菌工作，缺点是传热壁较厚，冷却水流速低，降温效果差。对大型反应器，多采用反应器内装有蛇形管换热装置，它的优点是管内冷却水流速大，传热效率高，但它需要占用反应器空间，并给反应器清洗和灭菌增加了难度。

（4）消泡系统：消泡系统对需氧细胞反应过程非常重要，这是因为反应液中的蛋白质或多肽皆为表面活性剂，它的存在会使反应液在通气和搅拌的条件下产生泡沫，过量的泡沫会堵塞空气出口过滤器，或导致反应液泄漏，或造成反应器压力升高，因此要从反应器设计和操作两个方面进行泡沫控制。从设计方面要求，反应器装液量一般不超过总体积的 70% ~ 80%，这一方面是由于通气后反应器内的液位会有所升高，另一方面是为了预留部分空间，以便为消除泡沫提供一缓冲的空间。同时，常在反应器顶部装有一消泡桨，以通过机械作用消除泡沫。在操作方面，通常采用添加化学消泡剂的方法。植物油、聚醚类非离子型表面活性剂都可用以化学消泡，或直接加入培养基中，或在反应进行过程中加入。通常装有液位电极，一旦泡沫达到相应高度，就可通过消泡控制装置自动向反应器中流加消泡剂。

（5）pH 控制系统：细胞生长反应都有最适 pH，因此须对反应液的 pH 进行检测和控制。pH 控制系统包括 pH 电极，酸、碱储罐及相应的控制系统。根据不同反应的需要，可加酸或加碱。对流加培养，通过其补料已能起到调节 pH 的作用，例如在青霉素发酵中，通过控制葡萄糖的流加速率来控制反应液的 pH。

7.2.2　搅拌功率的计算

搅拌功率指搅拌器输入搅拌流体的功率，即用以克服流体阻力所需用的功率，简称为轴功率。

1. 搅拌功率的基本计算方程　影响搅拌功率计算的因素主要有反应器的设备参数（包括反应器直径 D、液柱高度 H_L、搅拌器直径 d、挡板的数量和宽度 W）、反应液物性参数（包括液体密度 ρ_L 和黏度 μ_L）和操作参数（转数 N）等。

由于反应器直径 D、液柱高度 H_L、挡板的宽度 W 都与搅拌器的直径 d 有一定比例关系，故可不作为独立变量，于是有：

$$P = f(d, N, \rho_L, \mu_L, g) \tag{7-7}$$

式中，ρ_L 是液体密度（$kg \cdot m^{-3}$）。

通过量纲分析与实验证明，对无通气的牛顿型流体，可得到如下关联式：

$$N_P = K Re^X Fr^Y \tag{7-8}$$

或

$$\frac{P}{N^3 d^5 \rho_L} = K\left(\frac{N d^2 \rho_L}{\mu_L}\right)^X \left(\frac{N^2 d}{g}\right)^Y \tag{7-9}$$

式中：N_P 表示功率准数，表征机械搅拌所施于单位体积被搅拌液体的外力与单位体积被搅拌液体的惯性力之比；Re 表示搅拌雷诺准数；Fr 表示搅拌弗鲁特准数；K 表示与反应器几何尺寸、搅拌器型号有关的常数；X、Y 表示关联参数。

2. 无通气时牛顿型流体的搅拌功率　在全挡板条件下无旋涡时，则 $Y = 0$，$Fr = 1$。所以，在全挡板、无通气、牛顿型反应液条件下有：

$$N_P = K Re^X \tag{7-10}$$

即 N_P 仅是 Re 的函数，与流体的流动状态有关。

在 $D/d=3$，$H_L/d=3$，$B/d=1$，$D/W=10$ 的比例尺寸下进行实验，平叶涡轮桨、平叶桨和螺旋桨的功率准数与搅拌雷诺准数的关联曲线如图 7-10 所示。

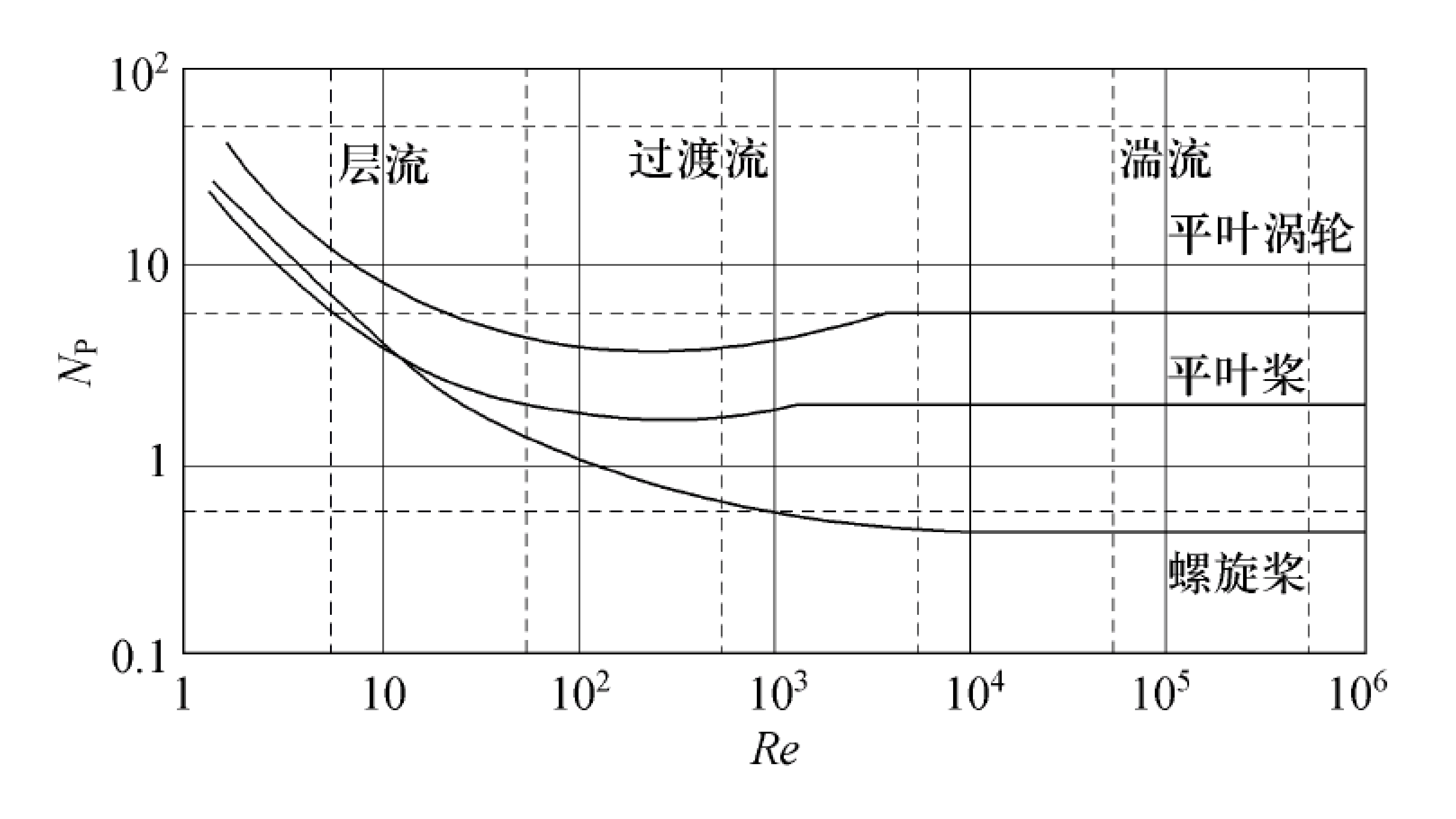


图 7-10　搅拌器的 $Re-N_P$ 关系曲线

根据图 7-10，可以看出：

当 $Re<10$，流体处于层流状态，此时 $X=-1$，则

$$N_P=KRe^{-1} \tag{7-11}$$

或表示为

$$P=K\mu_L N^2 d^3 \tag{7-12}$$

当 $Re>10^4$，流体处于湍流状态，此时 $X=0$，这表明在湍流阶段，功率准数与搅拌雷诺准数无关，则

$$N_P=K \tag{7-13}$$

或为

$$N_P=K\rho_L N^3 d^5 \tag{7-14}$$

从式（7-12）和式（7-14）中可以看出：①层流状态所需功率与液体密度无关，而与液体黏度成正比；②湍流状态所需功率则与液体黏度无关，但与液体密度成正比；③搅拌器直径大小对功率消耗的影响明显大于搅拌速度大小对功率消耗的影响程度。

不同搅拌器的 K 值如表 7-1 所示。

表 7-1　不同搅拌器的 K 值

搅拌器的型号	K 值		搅拌器的型号	K 值	
	滞流	湍流		滞流	湍流
三叶螺旋桨，螺距 = d	41.0	0.32	六箭叶涡轮搅拌器	70.0	4.0
三叶螺旋桨，螺距 = 2d	43.5	1.0	六弯叶封闭式涡轮搅拌器	97.5	1.08
四平叶涡轮搅拌器	70.0	4.50	平桨式	35.0	2.0
六平叶涡轮搅拌器	71.0	6.10	锚式	420.0	0.35
六弯叶涡轮搅拌器	71.0	4.80	螺带式	1000.0	0.35

在多数情况下，搅拌器在湍流情况下操作，故可用式（7-14）计算搅拌功率。而对于 $10<Re<10^4$ 的过渡流状态，液体的密度和黏度均影响其功率消耗，K 与 X 均随 Re 而变化。

与上述标准的反应器几何尺寸比例不一致的实际反应器，其搅拌功率 P^* 可按式（7-15）求出：

$$P^*=fP \tag{7-15}$$

式中，f 为校正系数。

$$f = \frac{1}{3}\sqrt{\left(\frac{D}{d}\right)^{*}\left(\frac{H_L}{d}\right)^{*}} \tag{7-16}$$

式中带 * 的数值表示为实际反应器的值。

多层搅拌器的功率可用下式计算：

$$P_m = P\ (0.4 + 0.6m) \tag{7-17}$$

式中：m 为搅拌器层数；P 为单层搅拌器的功率（W）。

3. 无通气时非牛顿型流体的搅拌功率　估算非牛顿型流体的搅拌功率将更加困难。这是因为：一方面对高黏性流体要达到充分的湍流状态几乎是不可能的，因此 N_P 值总是与 Re 的值相关；另一方面非牛顿型流体的黏度是随剪切情况而变化的。因此搅拌雷诺准数是以流体的表观黏度定义的，即：

$$Re = \frac{Nd^2\rho_L}{\mu_a} \tag{7-18}$$

对细胞反应过程，大部分非牛顿型流体为假塑性流体，又称幂律流体。该流体的表观黏度为 $\mu_a = K\gamma^{n-1}$，所以：

$$Re = \frac{Nd^2\rho_L}{K\gamma^{n-1}} \tag{7-19}$$

在搅拌槽内，时均剪切率 γ_{av} 是搅拌速度的线性函数，即：

$$\gamma_{av} = kN \tag{7-20}$$

式中：γ_{av} 为时均剪切率（s^{-1}）；k 为与搅拌器形式有关的常数；N 为搅拌速度（$r \cdot s^{-1}$）。

将式（7-20）代入式（7-19），得到：

$$Re = \frac{N^{2-n}d^2\rho_L}{k^{n-1}K} \tag{7-21}$$

不同搅拌器的 k 值如表 7-2 所示。

表 7-2　不同搅拌器的 k 值

搅拌器类型	涡轮式	平桨式	螺旋式	锚式	螺带式
k 值	10 ~ 13	10 ~ 13	10	20 ~ 25	30

需要指出的是，非牛顿型流体的表观黏度 μ_a 在反应过程中是变化的。

图 7-11 为非牛顿型流体的功率准数与搅拌雷诺准数的关系曲线。从图中可以看出，当 $Re < 40$ 时，液体处于滞流状态，N_P 与 Re 成为斜率为 −1 的直线；当 $Re > 500$ 时，液体处于湍流状态，N_P 保持恒定；而 $10 < Re < 500$ 时，液体为过渡流状态，此时 N_P 与 Re 之间的关系则比较复杂。

4. 通气状态下的搅拌功率　由于通气时流体的密度减小，并且在搅拌桨叶的尾部存在气穴，致使流体流动的阻力减小，因此通气时所消耗的搅拌功率要小于未通气时的搅拌功率消耗。一般搅拌功率要下降到原功率的 1/2 ~ 1/3。但由于搅拌槽中气体分散状况的不连续性和随机性，若要得到一准确预测功率消耗的关系式是困难的。常用的方法是将通气与非通气时所消耗的功率之比作为有关条件的函数来加以描述。

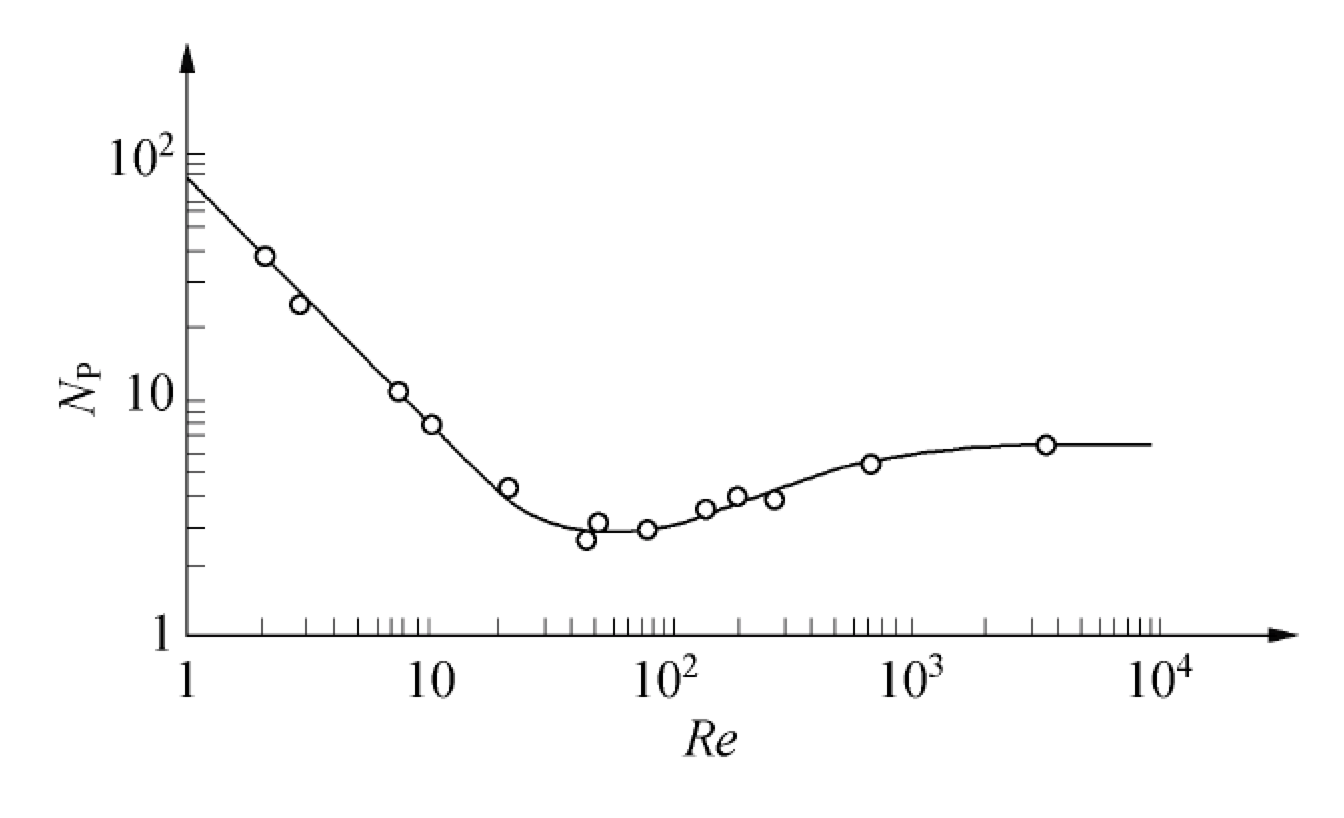


图 7-11　非牛顿型流体 N_P 与 Re 之间的关系曲线

Hughmark 提出关联式为

$$\frac{P_g}{P}=0.10\left(\frac{Q_g}{NV_L}\right)^{-0.25}\left(\frac{N^2d^4}{gW_iV_L^{2/3}}\right)^{-0.20} \tag{7-22}$$

式中：P_g、P 为分别为通气与未通气时的搅拌功率（W）；Q_g 为通气速率（L/s）；V_L 为液相体积（L）；W_i 为搅拌器桨叶宽度（m）。

Reuss 用无量纲分析得到下式：

$$\frac{P_g}{P}=0.0312F_r^{-1.6}Re^{0.064}N_a^{-0.38}\left(\frac{D}{d}\right)^{0.8} \tag{7-23}$$

式中，$N_a=\frac{Q_g}{Nd^3}$，为通气数。

Brown 提出下述关联式：

$$\frac{P_g}{P}=a\exp(-bQ_g) \tag{7-24}$$

式中，a、b 为与气体流速和搅拌器直径有关的关联系数。

根据上述关联式（7-22）、式（7-23）和式（7-24），以 $\frac{P_g}{P}$ 相对于 N_a 作图，如图 7-12 所示。

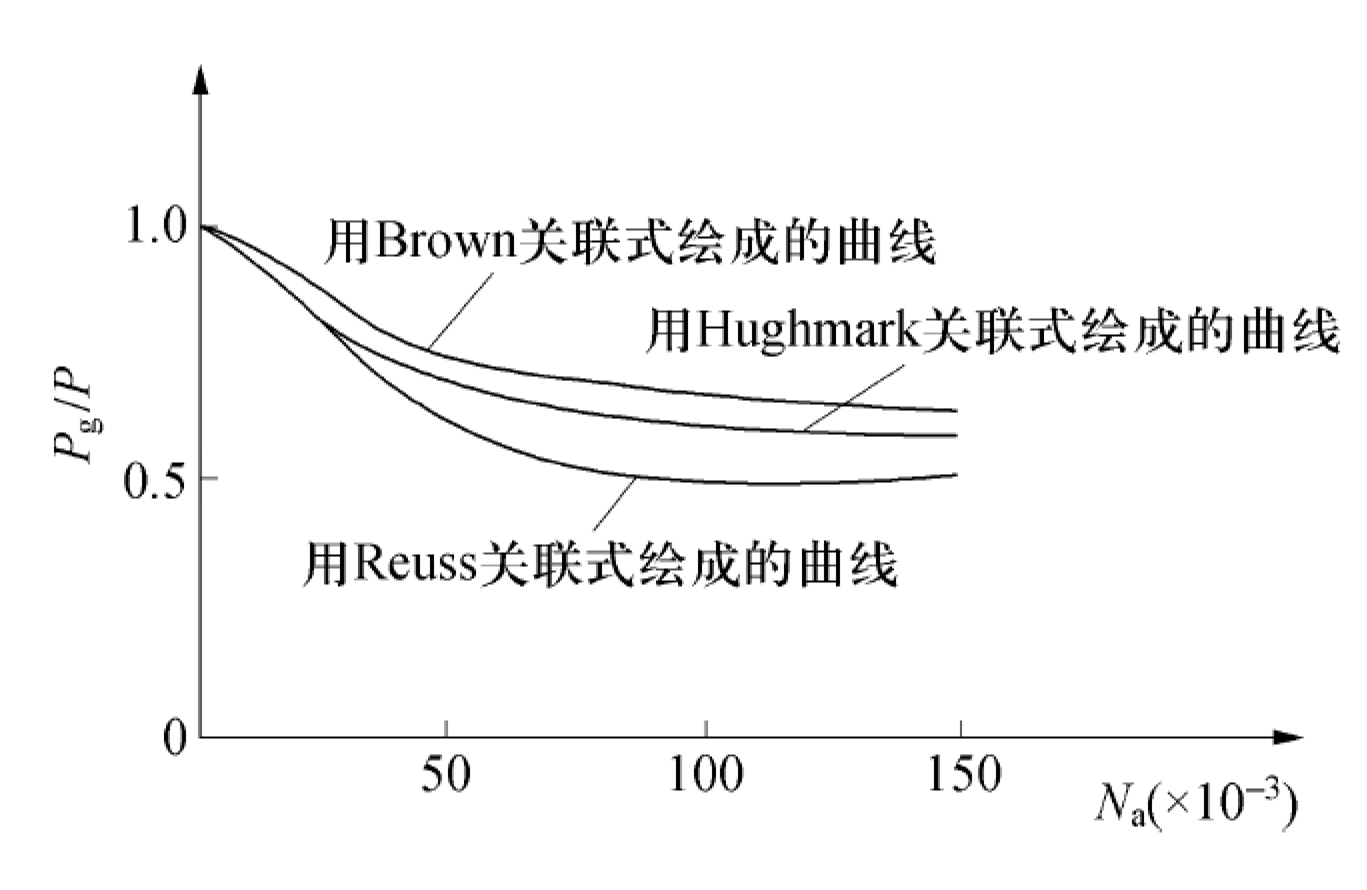


图 7-12　通气时的搅拌功率曲线

$H_L/D=0.47$；$N=2.6s^{-1}$

从图 7-12 可以看出，随着通气数 N_a 的增加，其功率消耗下降。近似估计，通气时功率消耗约为非通气时功率消耗的一半。

Michel 提出的经验关联式为

$$P_g = C\left(\frac{P^2 N d^3}{Q_g^{0.56}}\right)^{0.45} \tag{7-25}$$

在 d/D 值位于 1/2 ~ 1/3 时，c 为 0.101 ~ 0.157。

7.2.3　机械搅拌式生物反应器的应用

机械搅拌式生物反应器的优点是在操作上有较大的适应能力，气体分散良好，特别适用于放热量大和需要较高气含率的生物反应，是生物反应过程中应用最多的一类反应器。目前世界上约 95% 的生物产品如酶制剂、抗生素、氨基酸等都是用机械搅拌式生物反应器生产的。

（1）酶制剂：早期的酶制剂都是从动物、植物中提取的，但是动、植物资源受到各种条件的限制，不易扩大生产。微生物具有生长迅速、种类繁多的特点，再加上几乎所有的动、植物酶都可以由微生物得到，且微生物易变异，通过菌种改良可以进一步提高酶的产量，改善酶的生产和酶的性质，因此目前工业酶制剂几乎都是用微生物发酵进行大规模制造的。微生物发酵生产酶的方法，一般有固态法和深层液体发酵法两种。在机械搅拌式生物反应器中进行微生物深层液体培养，是目前酶制剂生产中最广泛应用的方法，此种方法机械化程度高，发酵条件易控制，因此酶的产率高、性质优良。

（2）抗生素：抗生素是青霉素、链霉素、红霉素等一类化学物质的总称，它是生物，包括微生物、动物和植物在其生命活动过程中产生的，并能在低、微浓度下有选择性地抑制或杀灭其他微生物或肿瘤细胞的有机物质。抗生素目前主要是用微生物在机械搅拌式生物反应器中发酵的方法生产的。接种量一般不小于 10%，发酵周期视抗生物品种和生产工艺而定。在整个发酵过程中，需不断通无菌空气和搅拌以维持一定罐压和溶氧，在罐的夹层或蛇管中需通冷却水以维持一定罐温。此外，还要加入消泡剂以控制泡沫，必要时还要加入酸、碱以调节发酵液的 pH，在有的品种发酵过程中还要加入葡萄糖、铵盐或前体以促进抗生素的生产。

（3）氨基酸：氨基酸是构成蛋白质的主要成分，主要应用在食品工业、饲料工业、医药工业、化学工业等。目前世界上可用发酵法生产的氨基酸已有 20 多种（包括酶法生产的氨基酸），其中用微生物在机械搅拌式生物反应器中进行发酵是主要方法。目前已经生产的二十几种氨基酸中，产量最大的是谷氨酸，约占总产量的 75%，其次为赖氨酸，约占产量的 10%，其他约占 15%。从消费构成来看，食品行业的用量约占 66%，饲料占 30%，其他 4%。日本在氨基酸的产量和技术上都居世界领先地位，其氨基酸产量占世界总产量的 32%，生产的品种达 26 个，其中 18 种几乎为日本所独有，占领了世界特殊用途氨基酸的全部市场。

机械搅拌式生物反应器的不足之处是内部结构复杂，不易清洗，动力消耗较大，特别是在丝状菌的培养中，搅拌桨的剪切应力会使菌体受到损伤。为了克服机械搅拌式生物反应器的不足，以气升式生物反应器为代表的非机械搅拌式生物反应器的开发与应用得到了迅速的发展。

7.3　气升式生物反应器

气升式生物反应器是在鼓泡反应器的基础上发展起来的，它以气体为动力，靠导流装置的引导，形成气液混合物的总体有序循环。器内分为上升管和下降管，向上升管通入气体，

使管内气含率升高，密度变轻，气液混合物向上升，气泡变大，至液面处部分气泡破裂，气体由排气口排出。剩下的气液混合物密度较上升管内的气液混合物大，由下降管下沉，形成循环。

气升式生物反应器的结构简单，不需搅拌，因此造价较低，易于清洗、维修，不易染菌，能耗低，装量系数可达 80%～90% 。但是，要求的通气量和通气压头较高，使空气净化工段的负荷增加，对于黏度较大的发酵液，溶氧系数较低。

7.3.1　气升式生物反应器的结构特点及操作

根据上升管和下降管的布置，可将气升式反应器分为两类：一类称为外循环式，通常将下降管置于反应器外部，以便加强传热，如图 7-13（a）所示；另一类为内循环式，上升管和下降管都在反应器内，循环在器内进行，结构较紧凑，多数内循环反应器内置同心轴导流筒，也有内置偏心导流筒或隔板的，如图 7-13（b）所示。

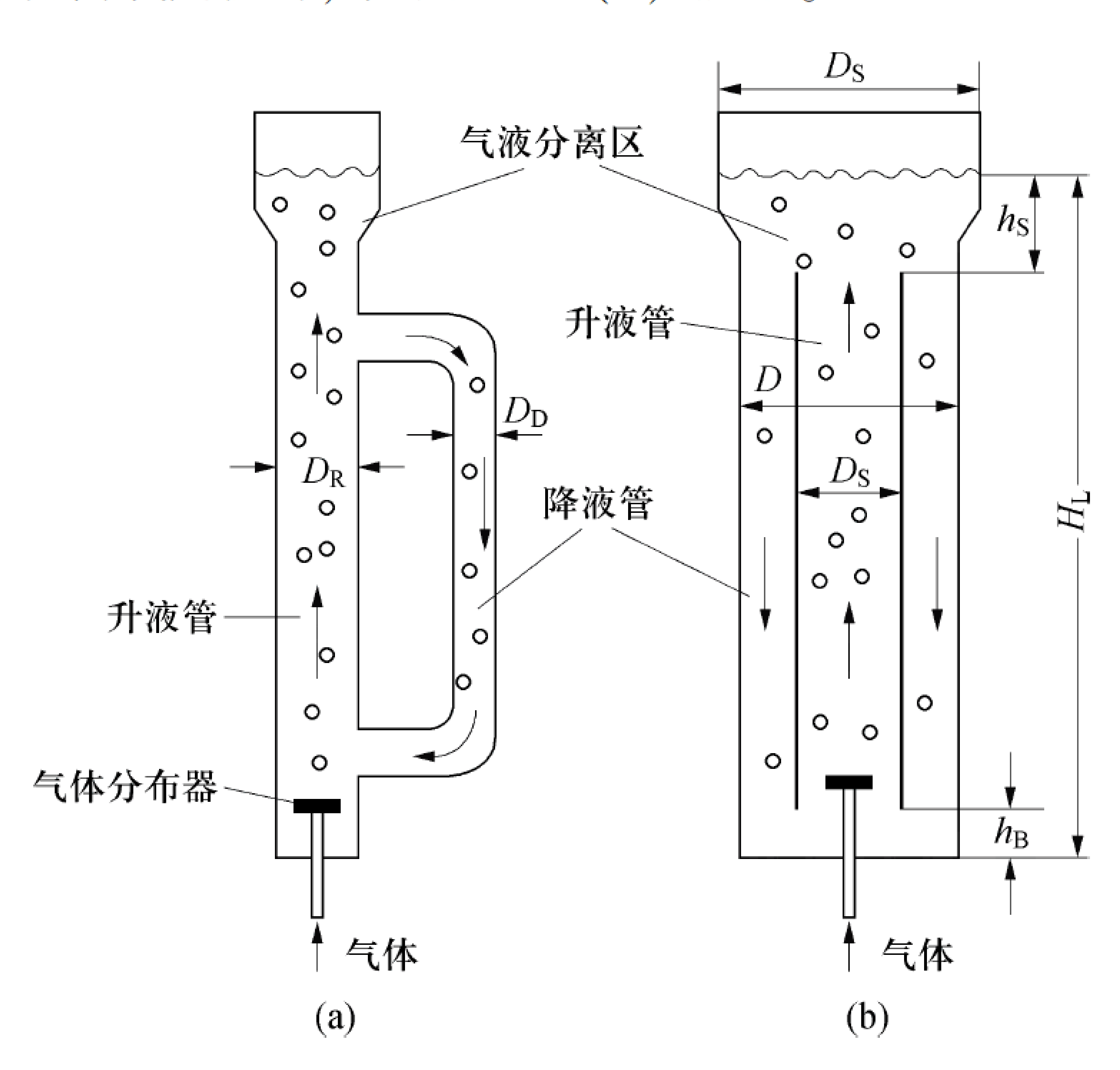


图 7-13　气升式反应器示意图

（a）外循环式；（b）内循环式

导流筒的主要作用是：将反应体系隔离为一通气区和非通气区，以使反应器中的流体产生上下流动，增强流体的轴向循环；使流体沿一固定方向运动，以减少气泡的兼并，有利于提高溶氧传递速率；使反应器内剪切应力分布更加均匀。

气升式生物反应器的气体导入方式有多种，基本可以归纳为鼓泡式和喷射式两种。鼓泡式导入气体常用气体分布器，气体分布器有单孔的、环形的，也有采用分布板的。喷射式导入气体通常是气液混合进入反应器的。驱动气体进入的方式分气泵压入或依靠液体速度吸入两种。

当气体通过分布器进入导流筒内时，导流筒成为升液管；若相反，气体直接进入导流筒和反应器筒体之间的环隙时，导流筒则为降液管。气体分布器附近和升液管内的流体密度较小，而反应器其他部位和降液管内流体密度则较大，因此在密度差的推动下实现流体的循环，以使其传递与混合过程得到强化。

多数气升式反应器的内部结构比较简单，除导流筒外就是一个空筒体，但也有为特殊目的增加内部构件的，如为降低循环速度和提高气液分散度在上升管内增加隔板，或者为均匀分布底物和分散发酵热，沿上升管轴向增加多个底物输入口。气升式反应器内部可分为 4 个流动状况差别较大的区域，即升液管区、降液管区、气液分离区和底部澄清区。内循环式反应器的重要结构参数如表 7-3 所示。

表 7-3　内循环式气升式反应器的主要结构参数

参数类型	计算式	参数类型	计算式
反应器的高径比	$S = H_L/D$	降液管与升液管的横截面积之比	$R = A_D/A_R$
气液分离区的无量纲高度	$T = h_S/D$	气液分离系数	$Y = (h_S + D)/D_S$
底部澄清区的无量纲高度	$B = h_B/D$	反应器直径	D

注：H_L 为反应器液面高度；D 为反应器直径；h_S 为升液管顶部与反应器物料液面间距离，为气液分离区的参数；h_B 为导流筒底边与反应器底部间距离，为底部澄清区的特征参数；A_D 和 A_R 分别为降液管和升液管的横截面积；Ds 为气液分离器的直径

气升式反应器的主要操作变量为通气量，即通气表观线速度。它通过对液体流动的影响，进而影响气含率、传递速率以及混合特性等。同时，反应器内部结构如降、升液管的横截面积的相对大小也会影响到这些特性。

（1）流体流速：对气升式反应器，升液管和降液管内流体产生循环流动，一方面由通气速率所造成流体密度差所驱动，另一方面又受到升降液管的横截面积变化的影响，这是影响液体流动速度的两个主要因素。

对空气－水体系，Gavrilescu 提出外循环气升式反应器升液管内液体上升速度 μ_{LR} 的关联式为：

$$\mu_{LR} = 4.25\mu_{GR}^{a}\left(\frac{A_D}{A_R}\right)^{0.95}\left(\frac{H_S}{H_D}\right)^{0.30} \tag{7-26}$$

式中：μ_{LR} 为升液管内液体上升速度（$m \cdot s^{-1}$）；μ_{GR} 为升液管内气体表观线速度（$m \cdot s^{-1}$）；A_D 、A_R 为降液管与升液管横截面积（m^2）；H_S 为升液管与降液管未通气时的液柱高度之差（m）；α 为模型参数。

该式表明，对一定通气速率，为保证流体的循环速度，需确定适宜的 A_D/A_R 和 H_S/H_D 值。对内循环式反应器，导流筒内液体流动速率 μ_{LR} 的关联式则为

$$\mu_{LR} = 1.57Fr^{0.42}B^{0.84}Y^{0.33}R^{0.63}\left(\frac{\mu_L}{\rho_L D}\right)^{0.01} \tag{7-27}$$

式中：Fr 为 Froude 数，$Fr = \dfrac{\mu_{GR}}{\sqrt{gD}}$；$B$、$Y$、$R$ 为表7-3 中表示的结构参数；μ_L（$Pa \cdot s$）、ρ_L（$kg \cdot m^{-3}$）为液体的黏度与密度。

该式表明，内循环式反应器液体流动速度主要取决于反应器的几何结构参数。

（2）气含率：气含率是气升式反应器的一个重要参数。气含率太低，氧传递不够，气含率太高使反应器的利用率降低，有时还会影响生物反应过程。气含率的经验关联式为：

$$\varepsilon_G = K\mu_G^{a}\left(\frac{A_D}{A_R}\right)^{\beta}\mu_L^{\gamma} \tag{7-28}$$

式中：ε_G 为反应器总气含率；μ_G 为通气表观速度（$m \cdot s^{-1}$）；μ_L 为液体黏度（$Pa \cdot s$）；K、α、β、γ 为关联参数。

（3）体积传递系数：体积传递系数常用经验公式表示如下所示。

$$k_L a = a\mu_G^{\beta} \tag{7-29}$$

式中：$k_L a$ 是体积溶氧传质系数（s^{-1}）；α 和 β 是经验常数。

Barker 和 Worgan 推荐，对于低黏度发酵液，$k_L a$ 与通气表观速度 μ_G 的关系如下所示。

$$k_L a = 853\mu_G^{0.78} \tag{7-30}$$

对于高黏度流体，其体积传递系数如下所示。

$$k_L a = 22.83 - 5.35n + 10.22n^2 \tag{7-31}$$

式中，n 为流变指数。

（4）循环周期与循环速度：发酵液在上升管内与大量空气接触，溶氧浓度较高，当发酵液进入下降管时，菌体消耗了氧，溶氧浓度逐渐降低，当发酵液再次进入上升管内时，重新补充氧，因此发酵液在下降管内的停留时间不能过长，这就对反应器的循环时间和循环速度提出了要求。

液体微元在反应器内循环一周所需的平均时间称为循环周期，亦即平均循环时间。循环周期通常为 2.5 ~4min。不同菌的需氧量不同，所能耐受的循环周期也不同，循环周期通常可由下式计算：

$$t_{um} = V_L/V_{\varepsilon} \tag{7-32}$$

式中：V_L 为发酵液体积（L）；V_{ε} 为发酵液体积循环流量（$L \cdot s^{-1}$）。

通常液体在循环管内的流速可取 1.2 ~1.4$m \cdot s^{-1}$。一般液体空管速度 μ_L 与气体空管速度 μ_G 的关系为

$$\mu_L = 1.15\mu_G^{0.41} \tag{7-33}$$

（5）流体的混合：可分为宏观混合与微观混合。造成气升式反应器内存在宏观混合的原因：一是由于流体流速分布不均和旋涡的存在；二是由于流体在反应器内的不断循环流动。随着流体循环次数的增加，返混程度亦在增大，当循环次数很大时，流体宏观混合可按全混流模型处理，当循环次数较小时，则可按轴向扩散模型处理。

（6）通气功率：气升式反应器的通气功率可由下式计算：

$$P_G = \rho_L gHQ \tag{7-34}$$

式中：ρ_L 为液体密度（$kg \cdot m^{-3}$）；g 为重力加速度（$m \cdot s^{-2}$）；H 为喷嘴距液面高度（m）；Q 为通气量（$m^3 \cdot s^{-1}$）。

7.3.2 气升式生物反应器的应用

由于气升式反应器具有较好的混合和低剪切应力的特性，它亦适用于固定化细胞反应体系。实践证明，对颗粒密度小、机械强度弱的固定化载体，例如水凝胶等，气升式反应器比填充床等更为有利。因此，对低黏性流体，且要求反应器生产规模较大时，则宜采用气升式反应器，其设备简单，操作方便，功率消耗少。在工业应用上，气升式生物反应器已有不少成功的例子，如单细胞蛋白、柠檬酸等。研究人员利用气升式生物反应器在优化工艺条件下高密度、高效培养被孢霉生产高纯度的花生四烯酸。研究人员利用气升式生物反应器进行红霉素的发酵研究，对影响红霉素产量的主要因素如流加速率、碳氮比和氧摄取速率等进行优

化，优化后发酵周期缩短了 13%，而红霉素产量提高了 10%。研究人员利用气升式生物反应器（容积 800L）发酵生产 *L*-天冬氨酸-*β*-脱羧酶和富马酸酶，研究结果表明气升式生物反应器与传统的机械搅拌式生物反应器相比，酶细胞收率提高了近 20%，发酵周期缩短了 40%，单位能耗降低了 70%，而生产强度提高了 25 倍。

气升式生物反应器由于其独特的周期变压与供氧特性，生产的酶的活力及其稳定性均很理想，而且反应体积越大，效果越理想。与传统的机械搅拌式生物反应器相比，在反应器综合性能、细胞得率、发酵周期、单位能耗和生产周期等方面均有良好的表现。气升式生物反应器在酶工程领域具有广泛的应用前景。

除此之外，气升式生物反应器在动、植物细胞的培养方面具有广阔的应用前景。研究人员利用气升式生物反应器进行规模化食用菌液体菌种的生产。在无菌条件下，将食用菌斜面菌种接入一级菌种用气升式生物反应器内的液体培养基中，室温培养，形成一级液体菌种；将发酵完成的一级菌种在无菌条件下分接至二级菌种用气升式生物反应器的各单元液体培养基中，经过 15～22d 二级连续培养，可获得大量食用菌液体菌种。该方法操作简单，安全可靠，价格低廉，无须摇床、设备简单，特别适用个体菇农使用，从而解决了个体菇农无法生产食用菌液体菌种的难题。研究人员用 20L 气升式生物反应器培养西藏红豆杉细胞生产紫杉醇和巴可亭Ⅲ，并与摇瓶培养进行了比较。研究发现，气升式生物反应器中紫杉醇浓度达到 20.84mg · L^{-1}，约为摇瓶培养的 2 倍。巴可亭Ⅲ在生物反应器中的浓度高于摇瓶培养并贯穿整个培养期，在生物反应器中的浓度达到 20.45mg · L^{-1}，约为摇瓶培养的 2 倍。以上研究结果表明，气升式生物反应器能够增加紫杉醇和巴可亭Ⅲ的产量，因而具有工业化应用的潜力。

研究人员发明了一种用气升式生物反应器高密度培养菲律宾蛤仔幼苗的方法。所采用的气升式生物反应器的容积为 100L，可在线检测工艺参数如温度、pH、气压和溶氧等，所培育的菲律宾蛤仔幼苗密度可达 280～350 个 · ml^{-1}。

7.4　膜生物反应器

膜生物反应器（MBR）是一种新型生物反应器，它是将膜与反应器组合成一个反应分离的单元设备。开发膜反应器的目的如下所述。

（1）增大反应速率：许多反应为产物抑制型，随反应的进程，产物浓度提高，反应速率下降。采用膜反应器可在反应过程中移去产物，使产物浓度保持恒定，反应速率因此会比原来提高。

（2）提高反应的最终选择性：具有多个副反应的体系，可通过选择适当的膜，在反应过程中将所需产物移出，截留反应物和副反应产物来提高选择性。

（3）及时移出产物使可逆反应的平衡右移，最终提高底物的转化率。

（4）简化生产步骤，使反应和分离在同一个单元里完成。

（5）截留生物催化剂，使细胞或酶在高浓度下运行，提高反应速率和产物浓度，减轻下一工段的负荷。同时可重复利用酶或细胞，以降低成本。

膜生物反应器通过膜的作用，使反应和产物分离同时进行，因此这种反应器也称为反应和分离耦合反应器。膜生物反应器的主要优点是减少产物抑制，提高反应速率，提高反应的选择性和转化程度；将生物催化剂截留于反应器内以反复利用，不但降低成本，并可获得细

胞的高密度培养；简化下游分离工艺，节约能耗。

7.4.1　膜生物反应器的结构特点及操作

根据膜反应器的不同特征，可进行如下的分类：

(1) 根据反应器内生物催化剂的状态，可分为游离态和固定化膜反应器。游离态膜反应器中的酶或细胞均匀地分布在反应物相中，反应在接近本征动力学的状态下进行，但催化剂易发生剪切失活，装置性能受浓差极化和膜污染的影响显著。固定化膜反应器中，生物催化剂装填密度高，反应器的生产能力和稳定性高，但催化剂分布不均匀，传质阻力较大。

(2) 根据底物和产物通过膜的传质推动力，可分为压差推动（微滤、超滤和反渗透膜）、浓差推动（透析和渗透膜）和电势差驱动（离子交换膜）的膜反应器。

(3) 根据膜材料的特性，可分为微滤膜反应器、反渗透膜反应器、超滤膜反应器、纳滤膜反应器和透析膜反应器，以及对称膜和非对称膜反应器等。表 7-4 列出了各种膜的主要特性。

表 7-4　膜及其相关分离过程的主要特性

过程	膜类型	推动力	应用对象
微滤	对称微孔膜 0.05 ~ 10μm	压力 0.1 ~ 0.5MPa	灭菌、澄清、细胞收集
超滤	不对称微孔膜 1 ~ 20nm	压力 0.2 ~ 1MPa	大分子物质分离
纳滤	不对称或复合膜≤1nm	压力 0.5 ~ 1.5MPa	大分子与小分子的分级、浓缩
反渗透	带皮层的不对称膜	压力 1 ~ 10MPa	小分子溶质的浓缩
透析	对称或不对称膜	浓度梯度	脱除小分子有机物或无机物离子
电渗析	离子交换膜	电位差	离子和蛋白质分离

(4) 根据膜反应器的结构形式，可分为平板膜、螺旋卷绕膜、管状膜及中空纤维膜等膜反应器。其差别在于结构的复杂性、装填密度、膜的更换、抗污染能力、清洗和成本等方面有所不同。

(5) 根据反应和分离的耦合方式不同，可分为分置式和一体式膜反应器：分置式指膜组件与生物反应器分开设置；一体式指膜组件安置在生物反应器内部。

(6) 根据反应器内流体与生物催化剂的接触形式，可将膜反应器分为直接接触式、扩散式和异相反应式 3 类，如图 7-14 所示。

直接接触式的特点是：膜只起分离作用，反应区与分离区分开；通常酶或细胞呈游离状态；底物直接加入含有生物催化剂的一侧；产物在压差推动下通过膜进入渗透液并排出反应器；反应液可循环操作以提高反应物转化程度，消除膜的浓差极化现象。扩散式的特点是：底物从进料一侧以扩散方式透过膜进入含有生物催化剂的另一侧进行反应；产物则沿相反方向从含生物催化剂一侧透过膜进入含底物溶液再排出；膜除了起分离作用之外，同时起到催化作用，细胞、酶固定于膜上，成为具有催化功能的分离膜；浓度差为其推动力。异相反应式的特点是：利用膜实现不同相间的隔离；提供相界面的反应接触区和界面催化剂。

典型的膜生物反应器主要有两种，即生物催化剂悬浮的膜生物反应器和生物催化剂固定的膜生物反应器。

(1) 生物催化剂悬浮的膜生物反应器：该膜反应器中，膜仅起分离作用，催化反应器

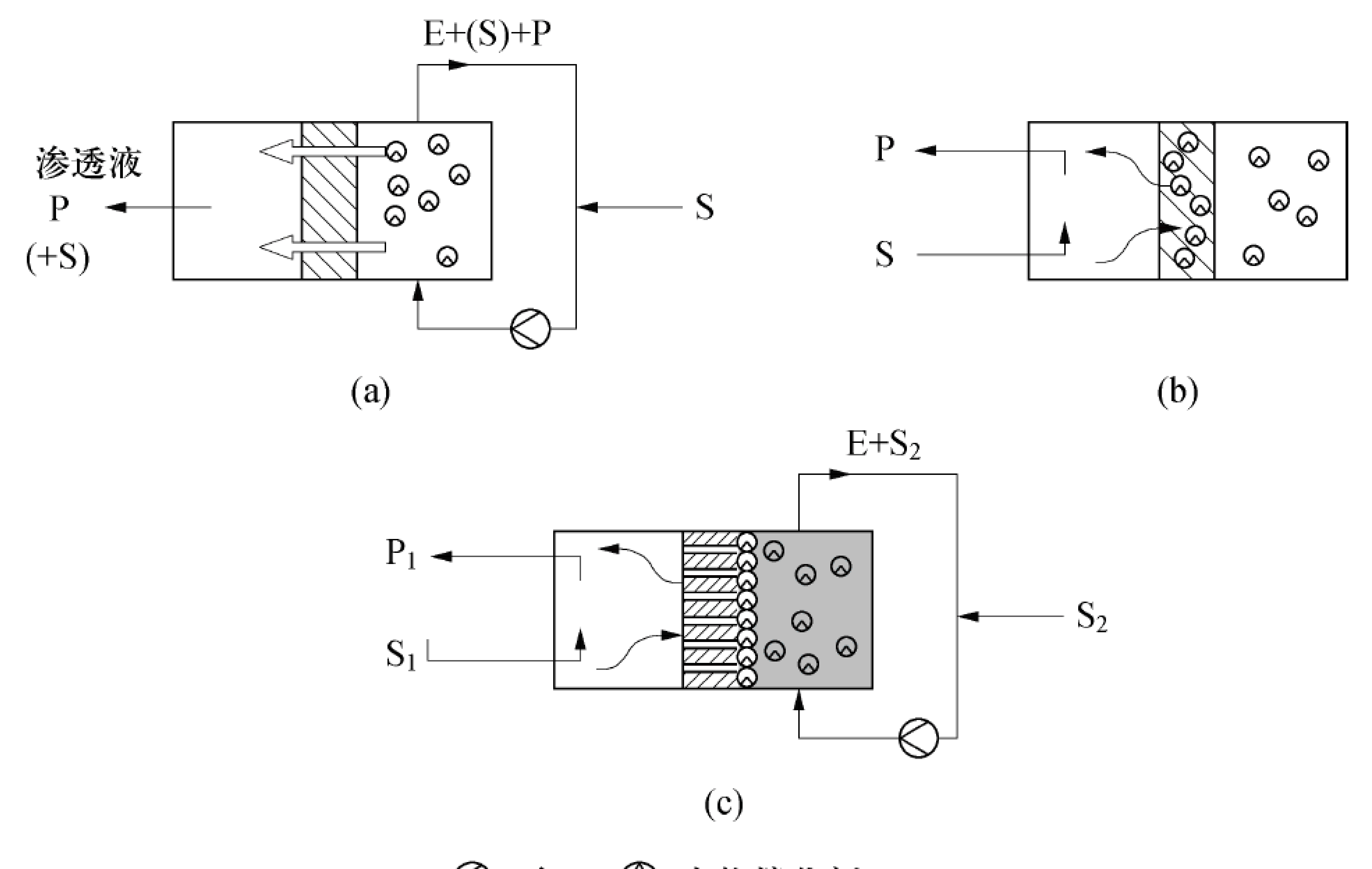


图 7-14　膜反应器的操作方式

（a）直接接触式；（b）扩散式；（c）异相反应式

和膜分离单元共同组成了反应与分离相耦合的体系。该类反应器的主要特点是反应底物直接加到含有生物催化剂的反应区域并能立即进行反应，生物催化剂的损失小，操作简单，反应区与分离区的操作可分别优化。这种操作方式即为前面提到的直接接触式。此种膜反应器又称为超滤式连续操作的搅拌槽式反应器或循环式膜反应器，如图 7-15 所示。

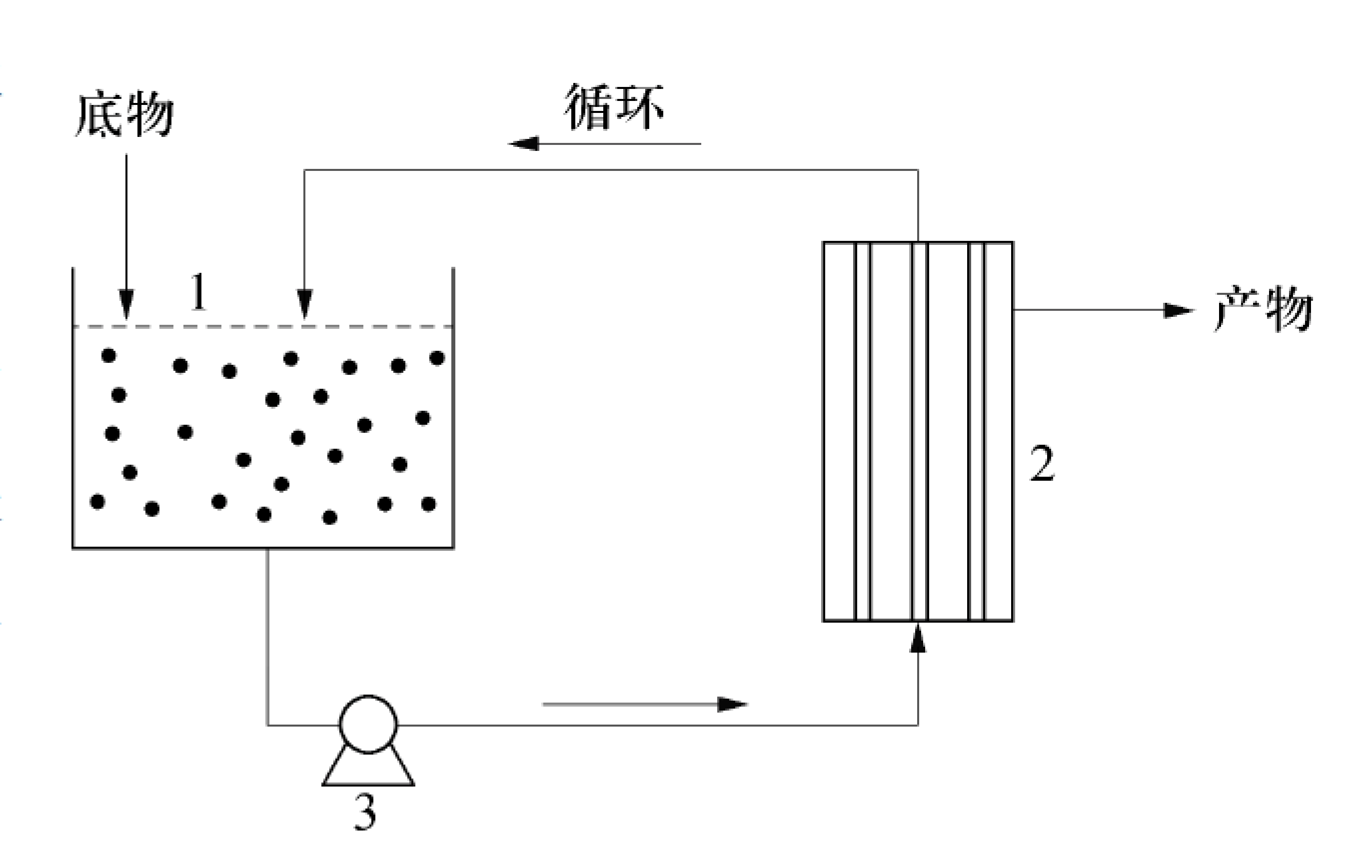


图 7-15　循环式膜反应器

（2）生物催化剂固定的膜生物反应器：在该类反应器中，将细胞或酶直接固定在膜的表面上，或固定在两膜之间。其主要特征是：底物从进料一侧以扩散方式通过膜而进入含有催化剂的一侧进行反应；反应产物则沿着相反方向通过膜进入反应液中，然后排出；底物和产物通过膜的推动力可以是浓度差或压差，如果是前者，则底物通过膜的扩散是其控制步骤；膜同时具有催化和分离的两种功能，又称为催化功能分离膜生物反应器。这种操作方式又常称为扩散方式。图 7-16 表示了用膜固定细胞的两种方式。

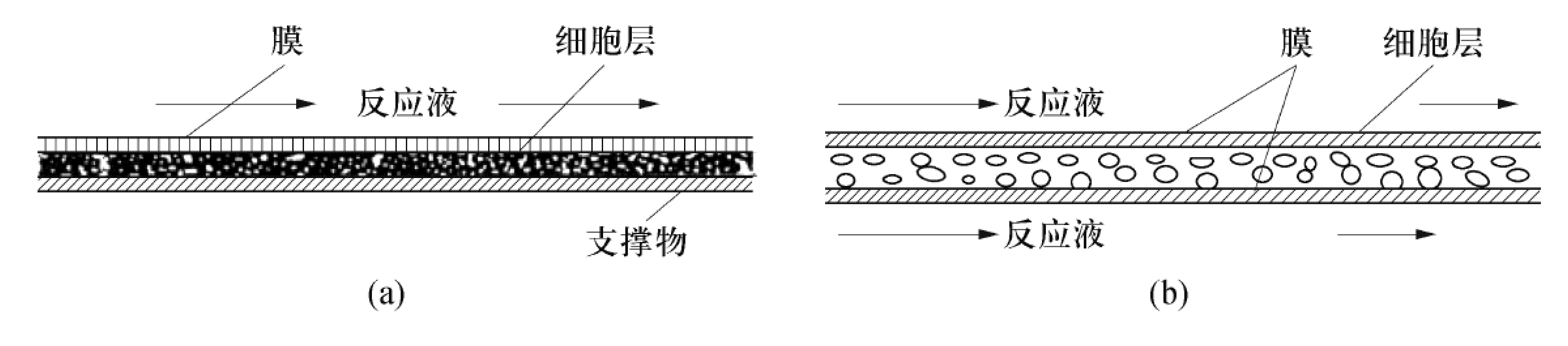


图 7-16　用膜固定细胞的两种典型方式

（a）细胞固定在膜和另一层支撑物之间；（b）细胞固定在两层膜之间

图 7-16（a）表示的是将细胞或酶固定在一层膜和一支撑物之间，底物从膜上流过并通过膜渗透到细胞层中，利用中空纤维膜进行动、植物细胞固定化培养属于此类情况。

图 7-16（b）表示的是将细胞固定在两层膜之间，底物从膜外流过，通过膜渗透到细胞层中。平板膜反应器和螺旋卷绕膜反应器常采用此种方式。

此类反应器中最具代表性的是中空纤维膜反应器，如图 7-17 所示。该反应器为一特制的圆筒，里面装有数千根中空纤维。细胞或酶固定在中空纤维外壁和反应器壳体的内壁之间，或者说，生物催化剂填充在反应器内，而大量的中空纤维则从中穿过。根据反应物的流动特点，该反应器又可分为扩散型和对流型两类。

① 扩散型中空纤维反应器：它的操作特点是反应物从中空纤维管内腔通过（即图 7-17 中 A、D 端打开，B、C 端关闭）并以扩散的方式通过膜，与壳层生物催化剂相接触并反应，所生成的产物再扩散入膜并进入纤维管内腔。此时反应物和产物的扩散速率和反应速率的相对大小控制了整个反应的速率。如果生物催化剂的浓度足够高，反应物转化为产物的转化率就完全受反应物和产物的扩散速率所控制。

② 对流型中空纤维膜反应器。它的特点是反应物也在壳层流动（即图 7-17 中 A、C 端打开，B、D 端关闭），并与生物催化剂以对流方式进行接触和反应，未反应物和产物再通过膜进入腔层。此种反应器由于强化了传质过程，则宏观反应速率得以提高。

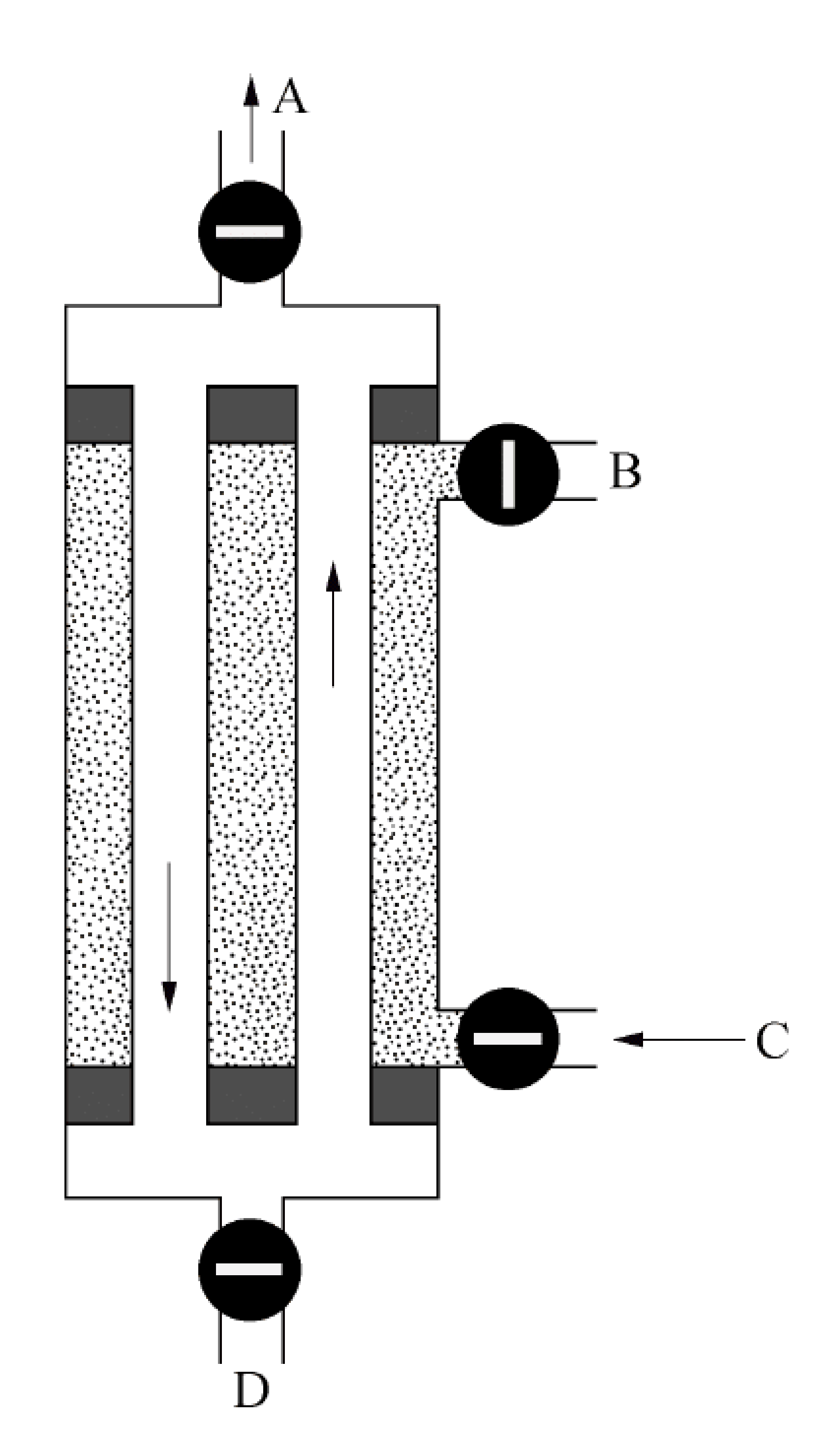


图 7-17　中空纤维膜生物反应器示意图

对需氧的细胞反应，采用的操作方式是将培养基加入反应器壳层，并使之流动，而空气则在中空纤维管内腔通过并供给管外细胞呼吸。

7.4.2　膜生物反应器的应用

膜生物反应器在生物加工过程中已广泛应用，也是近年来生物反应器研究开发的一个重要领域。对酶催化反应过程，它已用于生物大分子的水解、辅酶再生反应体系、有机相的酶催化反应和反胶团的酶催化反应等。对细胞反应过程，已用于酵母细胞的高密度培养、乙醇、丙酮 – 丁醇和乙酸、丙酸、丁酸及乳酸的发酵、动物细胞培养、植物细胞培养和废水的生物处理等。

1. 截流细胞或酶　膜生物反应器的最重要优点是把细胞或酶保留在反应器中。反应器连续灌流，在常规连续反应器中的洗出现象不会发生。膜也可同时将产品和细胞或酶分离，简化下游分离步骤。其他固定化技术也有这些特点，但是在膜包埋中，不使用化学试剂，条件不苛刻，膜包埋可能是最温和的方法。通过其他方法，酶的固定化一般会损失 10% ~ 90% 的活性，连接到表面的酶还会造成空间位阻和旋转障碍，降低产量和特异性，对于大分子底物尤为突出。相反，酶的膜包埋对其本征动力学没有很大影响。应用数学模型分析传质的影响，通过游离酶的动力学可精确预测膜反应器的性能。膜包埋很温和，对于易受伤害的哺乳动物细胞很适合，因为它们缺乏微生物细胞的弹性细胞壁，而且中空纤维具有很高的膜表面积，有利于贴壁依赖性细胞的附着生长。

在膜反应器中，通过细胞截留可达到高的细胞密度。在简单搅拌罐中，哺乳动物细胞密度一般是（1 ~ 2）$\times 10^6$ 个 · ml^{-1}。在中空纤维反应器中，哺乳动物细胞可长到充满整个有效体积，密度可达 $10^8 \sim 10^9$ 个 · ml^{-1}。用膜反应器生产单克隆抗体，基于高的细胞密度，

其体积生产能力比常规搅拌罐增加 50 倍。对于微生物过程也有相似的结果。在搅拌罐中，用流加培养技术可得到 $100g \cdot L^{-1}$ 的细胞浓度，而在中空纤维膜反应器中，细菌浓度可达 $500g \cdot L^{-1}$。在膜反应器中，最高的细胞密度达 10^{12} 个 $\cdot ml^{-1}$，最高的酵母细胞密度高达 10^{10} 个 $\cdot ml^{-1}$。与常规悬浮培养相比，膜反应器中的高细胞密度提高了反应器的生产能力。用德彼乳芽孢杆菌生产乳酸的体积生产能力提高了 12 ~ 40 倍，用脆壁克鲁维酵母生产乙醇的体积生产能力提高了 30 ~ 40 倍，用大肠杆菌生产 β-内酰胺酶的体积生产能力提高了 100 倍。

如果细胞易结团生长，如植物细胞，膜包埋特别有帮助。植物细胞产率与结团大小有关，在膜反应器中比在悬浮培养中更易于控制结团大小。结团造成其内部底物缺乏、中间代谢产物或激素积累，细胞间的相互作用很复杂。膜生物反应器也用于不同酶、辅因子或微生物的共包埋。例如，将辅因子（如 NAD^+）与大分子相结合（如聚乙烯醇），用超滤膜保留在反应器中。多种酶的共包埋成功用于复杂的酶反应。青霉素酰化酶与水溶性直链大分子共包埋，大分子网络对蛋白质的笼式效应，使酶更加稳定。

2. 选择性供应和除去不同化学物质　膜生物反应器的最重要特征之一是综合应用了分离过程广泛开发的技术。膜对不同物质的选择性透过性能，可用来去除抑制性代谢产物和回收不稳定产物，防止降解。用酶反应器水解蔗糖，可分离单糖和二糖。在包埋酵母的膜反应器中，可用反渗透膜选择性除去抑制剂乙醇而保留葡萄糖。在微生物燃料电池中，还使用了离子交换膜。

通过选择合适的膜孔径可浓缩大分子产物。应用于动物细胞培养中，可富集产物，降低分离成本，间歇或在操作结束时从细胞区收获浓缩产物。在中空纤维反应器中，用杂交瘤生产单克隆抗体的浓度高达 $4mg \cdot ml^{-1}$，而常规悬浮培养一般只有 $0.1mg \cdot ml^{-1}$。在比较这些结果时，因为细胞株和培养基不同，可比性差，不论怎样，用膜反应器增加了产物浓度。膜反应器截留了产物，也浓缩了蛋白酶，应考虑蛋白质水解的可能性。为了防止产物降解，要经常甚至连续除去产物。

有时，在反应器内也需要截留大分子营养物和中间代谢产物。在哺乳动物细胞培养中，主要成本来自于血清。用超滤膜把血清蛋白（如生长因子）截留在反应器细胞区内就很有价值，减少了血清用量。有时，在操作过程中需要补充血清蛋白，有时，只需在初始接种时添加血清蛋白。在常规细胞培养中，不需要的蛋白质浓度可能比产物浓度大几个数量级，对分离过程影响很大，因此在膜生物反应器中用较少的血清有利于产物回收和纯化。

3. 酶和细胞的保护　机械应力对菌丝体微生物、植物细胞尤其是动物细胞（缺乏坚硬的细胞壁）的活性有很大的影响。碰撞和机械搅拌造成的剪切以及气泡破裂引起的细胞损伤都有不同的作用。酶和简单原核生物（除放线菌以外）对反应器中的剪切应力不敏感，在搅拌罐中失活的原因是在气液界面蛋白质和其他生物大分子变性，在有泡沫时尤其严重。在循环式反应器中，微生物可以达到高密度，但是用泵使细胞通过外循环会造成伤害。在膜反应器中，这些问题都可以消除，酶或细胞处于相对静止的环境，免受机械伤害，而且一般不与空气直接接触。实际上，也正是酶反应器的这个特性吸引了研究人员的关注。乳酸脱氢酶和谷氨酸草酰乙酸转氨酶是胞内酶，检查其胞外水平，可作为细胞损伤的指示。实验表明膜截留对杂交瘤细胞的损伤程度小于搅拌罐中的损伤程度。

4. 在污水处理中的应用　自 20 世纪 60 年代以来，各国研究人员对膜生物反应器的研究投入大量精力，大大提高了其在污水处理领域的实用性。目前膜生物反应器应用较多的国

家是日本，英国、美国、法国等国也逐渐开始使用。

1）在生活污水处理中的应用：膜生物反应器应用于生活污水的处理研究得比较多，已经有很多较成熟的经验。研究人员分别采用板式和中空纤维膜生物反应器工艺处理城市生活污水，水力停留时间为24h，当进水COD为60~490mg·L^{-1}时，其去除率分别为>93%和80%~98%。研究人员采用中空纤维抽吸式聚乙烯膜生物反应器处理乡村生活污水，膜通量为121L·m^{-2}·h^{-1}，停留时间为13~16h，当进水BOD_5为（133±58）mg·L^{-1}、进水SS为（132±68）mg·L^{-1}、总氮为（32±19）mg·L^{-1}、总磷为（3.8±3.0）mg·L^{-1}时，去除率分别为99%、99%、83%、70%。研究人员进行了无机膜–生物反应器处理生活污水试验研究。结果表明，当停留时间为5h，膜通量为75~150L·m^{-2}·h^{-1}，膜面流速为4m·s^{-1}，SRT为5d、15d、30d时，分别经过10d、16d、14d运行，生物反应器中MLSS达到稳定值3.1g·L^{-1}、10.7g·L^{-1}、17.3g·L^{-1}。对COD、氨氮和浊度的去除率分别超过96%、95%、98%，对SS和*E. coli*的去除率则达到100%，试验出水水质优于建设部生活杂用水水质标准CJ2511289的指标。

2）在工业废水处理中的应用：国内学者采用由完全混合的厌氧生物反应器和板框式超滤膜组件构成的厌氧膜生物反应器对高浓度食品废水进行处理，废水主要来源为面粉压滤出水、洗肉水、蔬菜汁、器具清洗水等，有机物主要来自前3种水，试验也主要取这3种水配制。膜组件装填面积为0.64m^2，膜材质为聚醚砜（PES），膜截留相对分子质量为20000，停留时间对厌氧膜反应器的处理效果有重要影响，应大于50h。结果表明，COD负荷在2~3kg·m^{-3}·d^{-1}时，膜出水COD去除率可达80%~90%；当COD负荷大于4.5kg·m^{-3}·d^{-1}时，混合液VFA出现积累，COD去除率下降至70%，对SS、色度及细菌的去除率分别可达100%、98%和99.9%。

3）在处理粪便污水中的应用研究：粪便污水中含有较高的COD、N、P和病原菌。采用常规生化方法处理粪便污水必须先将污水进行稀释，并且当污泥浓度很高时，二沉池难以正常运行，影响了出水水质，增加了后处理的负荷。膜生物反应器工艺使粪便污水不经稀释直接进行处理成为可能，并取得了前所未有的处理效果。日本采用膜生物反应器工艺进行粪便污水处理已有十几年的历史。日本山梨县采用超滤膜组件与高浓度的活性污泥法组合的膜生物反应器技术处理规模为40m^3·d^{-1}的粪便污水，该工艺主要处理流程为：活性污泥→膜分离组合工艺→混凝→膜分离组合工艺→活性炭吸附→出水。第一段膜每隔1~2个月用200mg·L^{-1}的次氯酸钠冲洗1次，第二段膜每隔2周用500mg·L^{-1}的溴酸冲洗1次。膜装置已运行2年没有换膜，经活性污泥–膜分离处理后，BOD和总氮可分别去除≥99%，混凝–膜分离可去除残存COD_{Mn}的50%~70%，活性炭吸附可再进一步去除60%~90%，使系统出水BOD<5mg·L^{-1}，总氮<10mg·L^{-1}，色度<10。

4）在垃圾渗滤液处理中的应用：垃圾渗滤液含有高浓度的污染物，其水质水量随气候与操作运行条件的变化而变化。1994年前就有多家污水处理厂用MBR技术处理该种污水。美国Envirogen公司开发出一种膜生物反应器用于土地填埋场渗滤液的处理，并在新泽西建成一个日处理能力约为1500m^3的装置，在2000年年底投入运行。该种膜生物反应器使用一种自然存在的混合菌来分解渗滤液中的烃和氯代化合物，其处理污染物的浓度为常规废水处理装置的50~100倍。能达到这一处理效果的原因是，膜生物反应器能够保留高效细菌并使细菌浓度达到50000g·L^{-1}。在现场中试中，进液COD由每升几百毫克增至40000mg·L^{-1}，污染物的去除率大于90%。国内学者用垃圾渗滤液UASB出水作为膜反应器的入水进行了小试

研究，进水 COD 为 800 ~ 1700mg · L^{-1}，BOD_5 为 200 ~ 500mg · L^{-1}，NH_3-N 为 50 ~ 430mg · L^{-1}，在试验的前 72d，COD 去除率维持在 70% ~ 85%，出水 COD < 300mg · L^{-1}，达到二级排放标准，氨氮的去除率基本维持在 90.0% ~ 99.8%。

5）在废气处理中的应用：如前所述，膜生物反应器已广泛应用于处理工业污水和城市污水等。早在 20 世纪 80 年代，国外就开始将膜生物反应器用于废气处理。膜生物反应器处理废气是将高效膜分离技术和生物反应器的生物降解作用结合起来用于废气处理的一项新工艺。到目前为止，用膜生物反应器对多种废气处理进行了实验研究，如二甲苯、甲苯、己烷、丙烯、二甲基硫醚等。膜生物反应器用于废气处理的膜材料有两类：微孔膜（如疏水性复合膜）和致密膜（如硅橡胶膜）。疏水性微孔膜是用聚丙烯、聚四氟乙烯、聚砜等高分子材料合成的有机膜，如中空纤维膜，微孔膜的微孔直径一般为 0.01 ~ 1.0μm，因该类材料具有疏水性，一般水相不能进入微孔内，除非水相中有较大的压力，微孔内充满气体。相对于致密膜来讲，微孔膜有较高的通透性。用于废气处理的致密膜主要为管式硅橡胶膜，硅橡胶膜属于橡胶态或玻璃态合成高分子膜，其材料主体是链状结构的杂链化合物，由于在化合物中加入 Si，该膜兼有高分子材料和无机材料的双重特性；致密硅橡胶膜无孔、疏水、非极性，对某些气体有选择透过性，许多挥发性有机化合物可透过。用于废气处理的硅橡胶膜主要有聚二甲基硅氧烷膜（PDMS）、以聚偏氟乙烯（PVDF）为基体的 PDMS 膜等。膜生物反应器用于废气处理的膜组件常用的为中空纤维式和平板式。平板式膜生物反应器能获得更好的稳定性能。中空纤维式膜生物反应器有许多优点：可创造一个厌氧和好氧条件，能形成更大的比表面积，有利于微生物的生长并形成高密度的生物膜，允许更高的容积负荷率；降解反应和分离同时进行；对底物有选择性的扩散等。

膜生物反应器处理废气的主要影响因素有进气速率、进气浓度、气体停留时间、膜及膜组件、微生物种群、水相中的生物浓度和挥发性组分在生物膜中的扩散系数等。

目前常规的废气生物处理技术包括生物过滤法、生物吸附法（也称生物洗涤法）、生物滴滤法等。表 7-5 对膜生物反应器处理废气技术与常规废气生物处理技术进行了比较。

表 7-5　生物法处理废气比较

反应器	特　　点	优　　点	缺　　点
膜生物反应器	单个反应器；液相流动，既有固定的也有悬浮的生物相	占地面积小，处理效率高，反应器无活动组件，易放大；由于有水相存在，微生物有最佳的增湿效果和降解效率，且容易控制反应条件和去除最终产物；微生物不能通过膜面，因此微生物不污染气相，可用于室内空气的处理；具有较大的气液界面和优良的传质性能	投资费用高；传质阻力较大；微生物的过度生长引起水相管道的堵塞和不稳定的生物膜性能，导致反应器性能下降
生物过滤法	单个反应器；无流动液相，生物相固定	结构简单，投资及操作费用低；气液表面积比值高，能够处理较高亨利常数的污染废气	在处理氯化、含硫、含氨废气时，会导致氯离子、硫酸根离子、硝酸根离子的聚集，从而引起酸化，虽然添加缓冲试剂能防止酸化，但是最终产物不能中和，也难以去除；占地面积大，反应条件不易控制，不易处理高浓度废气

续表

反应器	特　点	优　点	缺　点
生物吸附法	两个反应器；液相流动；微生物悬浮生长在液体中	液相和气相各自独立，容易控制反应条件和去除最终产物；设备占地面积小，压力损失小，处理污染物浓度相对较高	在被微生物去除前，需扩散到水相，对于难溶于水的气体，传质阻力很大，需要大量氧才能维持较高的降解率，且需处理剩余污泥，故投资大，运行费用高，启动过程复杂
生物滴滤法	单个反应器；液相流动；微生物固定	液相和气相各自独立，容易控制反应条件和去除最终产物；设备较简单，能较好地截留生长缓慢的微生物	在被微生物去除前，需要扩散到水相，对于难溶于水的气体传质阻力很大，需处理剩余污泥，故运行费用高，启动过程较复杂

7.5　管式生物反应器

根据反应器的结构特征，可将其分为槽式、管式、塔式和膜式等类型，它们之间的主要差别为其外型（长径比）和内部结构的不同。在管式反应器中，当流体以流速较小的层流流动时，管内流体速度呈抛物线形分布；当流体以流速较大的湍流流动时，速度分布较为均匀，但边界层中速度减缓，径向和轴向存在一定程度的混合。流体流动速度分布不均或混合，将导致物料浓度分布不同，从而导致酶促反应速率计算的复杂性。

7.5.1　管式生物反应器的结构特点及操作

理想的连续管式反应器（CPFR）假设流体在一细长的空管中，以平稳、等速、不受干扰的方式向前流动，其流动模型符合活塞流流动模型的基本假设，即反应器的微元体沿同一方向以相同的速度向前移动；在微元体的流动方向上不存在“返混”现象；所有微元体在反应器中的停留时间都是相同的；与流体流动方向相垂直截面上物料的组成均一且不随时间变化。因此 CPFR 反应器具有如下操作特点：①反应进行过程中，反应物恒速连续加入和反应产物连续排出；②流体在反应器内沿流动方向以恒速向前流动，流体微元在反应器内的停留时间相同；③流体的流动方向上不存在流体的轴向混合，即不存在返混；而在垂直于流体流动方向的任一截面上，即径向上流速均一，混合均匀，流体如活塞一样有序地沿轴向流动，故称为活塞流模型或平推流模型。

7.5.2　管式生物反应器的应用

管式反应器与传统的搅拌槽式反应器相比，有许多优点。例如，具有较高的产率，较好的传热、传质性能，容易实现优化控制——程序控温、多点加料等。因此管式反应器可用于特殊的生化过程，例如对剪切敏感的组织培养过程、废水处理过程、固定化酶和固定化细胞的反应过程，以及要求严格控制反应时间的生化过程，例如灭菌和食品高温消毒等。

7.6　生物传感器及过程控制

微生物的生长是受内外条件相互作用调控的复杂过程，外部条件包括物理的、化学的及发酵液中的生物学条件，内部条件主要是细胞内部的生物反应。通常发酵过程的操作只能对外部因素进行直接控制，所谓控制一般是将环境因素调节到最适条件，使其利于细胞生长或产物的生成。因此，发酵过程的操作需要了解一些与环境条件和微生物生理状态有关的信息，即需要对过程参数进行检测。

7.6.1　生物反应过程的重要相关参数

小型反应器中可检测的状态变量较多，可用于工艺研究和开发。大型生产规模反应器中，为了降低染菌的风险，通常只对少数状态变量进行检测，从而防止由于传感器失常而影响发酵过程的控制。

发酵过程中需要检测的参数主要包括物理参数（表 7-6）、化学参数（表 7-7）和生物学参数（表 7-8）。在各种参数的检测过程中，常使用各种仪表（传感器）。

表 7-6　发酵过程物理参数的测定

参数名称	单位	测定方法	测定意义
温度	℃；K	传感器	维持生长、合成
罐压	Pa	压力表（工业）	维持正压，增加溶氧
空气流量	VVM，$m^3 \cdot h^{-1}$	传感器（实验室）	供氧，排出废气，提高 K_La
搅拌转速	$r \cdot min^{-1}$	传感器	物料混合，提高 K_La
搅拌功率	kW	传感器	反映搅拌情况，影响 K_La
黏度	$Pa \cdot s$	黏度计	反映菌体生长，影响 K_La
密度	$g \cdot cm^{-3}$	传感器	反映发酵液性质
装液量	m^3，L	传感器	反映发酵液数量
浊度	透光度%	传感器	反映菌体生长情况
泡沫		传感器	反映发酵代谢情况
体积传氧系数 k_La	h^{-1}	间接计算，在线检测	反映供氧效率
加消泡剂速率	$kg \cdot h^{-1}$	传感器	反映泡沫情况
加中间体或前体速率	$kg \cdot h^{-1}$	传感器	反映前体和基质利用情况
加其他基质速率	$kg \cdot h^{-1}$	传感器	反映基质利用情况

表 7-7　发酵过程化学参数的测定

参数名称	单位	测定方法	测定意义
酸碱度	pH	传感器	反映菌的代谢情况
溶氧	10^{-6}（ppm）	传感器	反映氧的供给和消耗情况
尾气氧浓度	Pa	传感器，热磁氧分析	了解耗氧情况
氧化还原电位	mV	传感器	反映菌的代谢情况

续表

参数名称	单位	测定方法	测定意义
溶解 CO_2 浓度	% 饱和度	传感器	了解 CO_2 对发酵的影响
尾气 CO_2 浓度	%	传感器，红外吸收	了解菌的呼吸情况
总糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉	$kg \cdot m^{-3}$	取样	了解基质在发酵过程中的变化
前体或中间体浓度	$mg \cdot ml^{-1}$	取样	产物生成情况
氨基酸浓度	$mg \cdot ml^{-1}$	取样	了解氨基酸含量的变化情况
矿物盐浓度 Fe^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Na^{+}、NH_4^{+}、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}	$mol \cdot L^{-1}$	取样，离子选择电极	了解离子含量对发酵的影响

表 7-8　发酵过程中生物学参数的测定

参数名称	单位	测定方法	测定意义
菌体浓度	g（DCW*）$\cdot L^{-1}$	取样	了解菌的生长情况
菌体中 RNA、DNA 含量	mg（DCW）$\cdot g^{-1}$	取样	了解菌的生长情况
菌体中 ATP、ADP、AMP 量	mg（DCW）$\cdot g^{-1}$	取样	了解菌的能量代谢情况
菌体中 NADH 量	mg（DCW）$\cdot g^{-1}$	在线荧光法	了解生长和产物情况
效价或产物浓度	$g \cdot ml^{-1}$	取样（传感器）	产物生成情况
细胞形态		取样，离线	了解菌的生长情况

*：细胞干重（dry cell weight，DCW）。

在诸多物理参数中，温度、压力、流量、转速、补料速度和泡沫水平是发酵过程中最重要的需随时检测和控制的参数，它们可以直接在线准确测量和控制。化学参数中，pH、溶氧和尾气组成可以进行在线检测，溶液成分的测定一般难于在线进行。目前细胞形态计算机图像分析系统可用于分析菌体的形态变化，并且能够快速、自动地给出生物学形态数据，从而用以指导发酵过程的控制，但是该仪器较为昂贵，难以推广应用。因此，需要开发廉价、简便、快速的在线检测技术，如激光测粒、荧光衍射等。

目前无法在线检测的化学和生物学参数，往往采用离线检测的方法，但检测时间长，所得数据无法用于实时控制。为了实现发酵过程中化学参数和生物学参数的在线检测，电极法和生物传感器已成为研究与开发的重点。目前，用于葡萄糖、乙醇和青霉素等物质在线检测的传感器已研究成功，并在离线的条件下获得广泛应用。

此外，在发酵过程中还有一些间接参数是由以上参数经计算得到的。例如，对发酵尾气组分分析获得的数据进行计算，可以得到耗氧速率、CO_2 释放率和呼吸商，进而可计算出菌体浓度和基质消耗速率等。另外，如呼吸强度、氧传递系数、比生成速率、菌体生长速率、产物得率等都可以通过间接计算的方法获得。它们是分析、判断和衡量发酵过程的重要参数，是对发酵过程进行控制的依据。

上述参数的检测结果反映了发酵过程中环境变化和细胞代谢的生理变化情况，从而为发

酵过程的研究和控制提供了重要依据。

7.6.2　典型生物传感器

传感器通常指能够将非电量转换为电量的器件，它实质上是一种功能块。在由传感器、放大器和各种仪器组成的测量、控制系统中，传感器的作用是感受被测量的变化，并直接从被测对象中提取检测信息，也即将来自外界的各种信号转换成电信号。电信号可比较容易地进行放大、反馈、微分、存储，以及由电子计算机进行数据处理和控制，因而是实现检测与自动化控制系统的首要环节。在一个现代化的自动检测系统中，如果没有传感器，就不能对被测参量实现精确、可靠的测量，也无法检测与控制表征生产过程各个环节的各种参数，所以，在现代技术中，传感器是自动化仪表、电子计算机控制系统中的关键组成部分。

传感器的检测对象非常多，主要有数量、长度、面积、体积、位置、含量、线性变化、旋转变化、畸变、压力、转矩、流量、流速、加速度、振动、成分配比、水分、离子强度、混浊度、粒状体、密度、伤痕、湿度、热量、温度、烟、有害气体和气味 28 种。检测手段主要有射线（γ 射线、X 射线等）、紫外线、可见光、激光、红外线、微波、电、磁和声波 9 种。传感器千差万别，种类繁多，有不同的分类方式。这里只介绍一些基本的在发酵过程中经常用到的在线测量传感器。

1. pH 检测及其传感器　微生物发酵过程中，发酵液的 pH 可以指示微生物细胞生长及产物或副产物生成的情况，是最重要的发酵过程参数之一。因为每种微生物细胞的生长繁殖均有其最适 pH，细胞及酶的生物催化反应也有相应的最佳 pH 范围。在培养基制备及产物提取、纯化过程中，也需控制适当的 pH。因此，发酵实验及生产中对 pH 的检测及控制极为重要。

pH 传感器多为组合式 pH 探头，由一个玻璃电极和参比电极组成，通过一个位于小的多孔塞上的液体接合点与培养基连接，多孔塞一般位于传感器的侧面。传感器的选择取决于发酵罐是原位灭菌还是在高压灭菌锅内灭菌：如果是原位灭菌，需将电极安装在一个由发酵罐制造商提供的专用外壳内，以使电极的外部在灭菌时能耐受大于 0.1MPa 的压力，这是为了防止罐压使物料流入多孔塞中；如果是高压灭菌锅灭菌，则需要采用特殊的电连接方式，以防由电极暴露于高压蒸气所带来的问题。

pH 探头是一种产生电压信号的电化学元件，其内阻相当高（$>10^9\Omega$），因此产生的电位只能由一种高输入阻抗的直流放大器来测量，这种放大器可以获取微量电流。许多 pH 计及控制器都含有合适的放大器。最好购买带有高电流或高电压信号输出的仪表，因为可以实现计算机数据记录。探头的高阻抗对传感器和 pH 计之间的连接器和电导线有严格要求。

在使用时，通常先将 pH 传感器加上不锈钢保护套，再插入发酵罐中。大多数 pH 传感器都具有温度补偿系统。由于电极内容物会随使用时间或高温灭菌而不断变化，因而在每批发酵灭菌操作前后均需进行标定，即用标准的 pH 缓冲液校准。通常 pH 传感器的测定范围是 0～14，精度达 ±0.05～0.1pH，响应时间为数秒至数十秒，灵敏度为 0.1pH。

pH 传感器在使用时需注意以下几点。

1）校准：必须在使用前对传感器进行校准，这通常是对发酵罐进行灭菌前的最后一步操作。传感器的校准在发酵罐外进行，将 pH 电极浸没到含一种或多种标准缓冲液的容器中进行校准。这些操作最好均在发酵运行温度下进行。pH 电极需与发酵过程中使用的 pH 计相连接，pH 计的校准装置可按常规的 pH 计校准步骤来调整。由于发酵过程中重新校准十

分困难或者不可能，最好能固定 pH 计的校准控制，以避免实验中的偶发性偏移，许多商业性的仪表都提供一些固定螺栓。

2）灭菌：校准以后，应该将传感器插入到发酵罐中并进行密封。在发酵罐灭菌时，一般将 pH 计的连接物移开（采用高压灭菌锅灭菌时），灭菌后重新连接，pH 传感器开始工作。也有实验操作人员用乙醇对 pH 传感器单独消毒（即不放入灭菌锅），主要是为了延长传感器的使用寿命。然后需将传感器立即插入且密封在罐内。必须指出，这一过程可能染菌，尽管有些报道称在研究中规范地使用这一步骤没有问题。这种方法简介如下：放好传感器，加上一个合适的配件以使 pH 探头易于由发酵罐顶盘进行安装，然后将其在无水乙醇中至少放置 1h。探头和配件必须是很干净的，探头的浸没位置应高于配件。最后，应迅速地将传感器转移到预先灭好菌的发酵罐中，其已与空气供应系统相连，而且其中的空气已开始流动。

3）校准的检查：在灭菌或使用过程中，很可能会使校准发生偏移。对于状况良好的传感器，这种偏移不会大于 0.2 个 pH 值。但一些研究人员仍建议在发酵罐灭菌以后，进行校准或者再校准。目前已有适用于较大发酵罐的这种系统，可以完全无菌地取出传感器，再将其部分地插入校准缓冲液中进行校准。在实验室规模下，有必要将传感器完全移出，利用前述的化学处理方法来进行再消毒。在实验中检查一个可疑校准的较好方法是对发酵液进行无菌取样，在发酵罐外测量其 pH，然后与传感器的读数进行比较。如果采用这一方法，应在取样后对 pH 尽快检测、读数。因为细胞在不断变化的条件下（例如在连续培养中氧和基质的消耗）进行连续代谢，如果培养基的缓冲性能较差，pH 在几分钟内即可发生显著变化，从而无法正确检查传感器的校准。

探头需时常地填充或填满电解液，实际上这是参比电极的电解液，它会通过多孔塞慢慢的流失。制造商会为其传感器提供专用液体，但许多实验人员愿意自己配制：浓缩或饱和的 KCl 溶液，有时添加一定的溶质来增加黏度（一般是当传感器在原位高压灭菌时）。理论上电解液液位应保持足够高，以使其静压超过发酵液，从而使通过多孔塞的流体倾向于从传感器流向发酵液，但实践中往往难以实现。尽管电解液液位高于发酵液，但是通风发酵罐的顶部空间压力一般会稍微高于大气压，这是由出口气体过滤器和出口管路的阻力造成的。而探头电解液室的顶部空间压力在操作过程中通常为大气压。0.01bar 的压差就需要探头具有 10cm 的顶部高度，这可能是实践中的最大值，这也是多孔塞结垢的部分原因。如果 pH 探头具有密封的外套，在发酵过程中可能有利于维持正的表压。

2. 温度检测及其传感器 大部分发酵过程的温度为 30～36℃，某些发酵过程要求温度波动限于 ±0.5℃。发酵过程中最大的生物活性，一般仅能在某一很小的温度范围内维持，因而需要有效地控制温度，使其适于细胞生长。温度是一个环境变量，不仅需要检测，通常也需要由闭环控制在所需的设定值进行控制。对于 0～130℃ 的温度范围，最好采用热电偶或基于电阻变化的温度计，如铂电阻（Pt100 或 Pt1000 传感器：0℃ 时电阻分为 100Ω 和 1000Ω），温度传感器通常安装在不锈钢外套中。采用合适的控制系统，在小型生物反应器中可获得 $\pm 10^{-2}$K 的精度，大型生物反应器中一般可达到 $\pm 5\times10^{-1}$K。

发酵罐的测温方法有多种，包括玻璃温度计、热电偶、热敏电阻、热电阻温度计等。大部分发酵罐采用酒精或水银温度计，可直接指示发酵温度，这种玻璃温度计必须能耐受灭菌时的蒸汽压力。将温度计安装在位于反应器内的不锈钢夹套内，采用 O 形环密封系统实现无菌操作。具有直流输出信号的温度传感器，一般可用于实现控制。常用的热电偶较为廉

价，但其分辨率低，需要冷接点。热敏电阻是半导体，其电导率可随温度发生变化，灵敏度高而且不贵，但它给出高度非线性的输出信号。现代积分电路结合了上述特点，能够得到线性的输出信号。

当温度的测量范围较小时，热电阻检测器（RTD）比热电偶更灵敏。其原理是所用的材料如铂或镍的电阻随温度变化而变化。铂或镍用做惠斯通电桥电路的一根线，另一根线为已知的精密电阻，电桥上施加一定电压，比较电路的每一支路中点的电压降，该点的电势差与每一支路上两个串联电阻的电阻值的比值成比例。由已知量可计算 RTD 的电阻，从而推定温度。如果 RTD 远离桥接电路，导线的电阻会影响测量。因而为实现高精度测量，常采用补偿电路，这要求增加 2 根或 4 根导线。在使用时，从发出的信号经放大（线性化）后传递到控制器，从而实现温度控制。

铂电阻温度计通常用做发酵温度测量的标准温度计。为避免染菌，温度计需装入不锈钢夹套中再放入反应器中，夹套中填有导热的液体，可保证温度计的充分接触和快速响应。热电阻温度计的工作原理是电阻随温度的变化而变化，因而需要一定的电流产生可测电压，此电压与温度呈一定的比例关系，这种电流很微弱，不会造成明显的热效应。但连接温度计的导线（通常很长）的电阻会随着环境温度的变化而变化，这些效应可通过用单独的导线来输送并检测电流来实现补偿。铂热阻温度计的优点是其精确度高，稳定性好，在正常温度范围内给出线性输出信号。实践中，当发酵液趋向非均一性时，几种温度计均可使用。不同测量范围（如 0～50℃、0～150℃）的温度计，可满足发酵和蒸汽灭菌的要求。

热敏电阻制成的 RTD 由半导体材料制成，在实验室中已普遍使用。其主要优点是对温度变化更灵敏，因而测量精确度高，缺点是对温度的变化具有非线性响应。

3. 溶氧检测及传感器　发酵液的溶氧浓度是一个非常重要的发酵参数，它既影响细胞的生长，也影响产物的生成。这是因为当发酵培养基中溶氧浓度很低时，细胞的供氧速率会受到限制。反应器条件下溶氧的检测远比温度检测要困难，低溶氧也使检测非常困难，除非采用直接的在线检测。

溶氧浓度的检测方法主要有 3 种，其共性是使用膜将测定点与发酵液分离，使用前均须进行校准。这 3 种方法为：①导管法；②质谱探头法；③电化学检测器。因为上述方法均使用膜，因而检测中出现的问题也具有某些共性。

在导管法中，将一种惰性气体通过渗透性的硅胶蛇形管充入反应器中。氧从发酵液跨过管壁扩散进入管内的惰性气流，扩散的驱动力是发酵液与惰性气体之间的氧浓度差。在蛇管出口处用氧气分析仪测定惰性混合气中的 O_2 浓度。这种方法的响应速率较慢，通常需要几分钟，因为管壁对其扩散产生一定的阻力，从而使气体从蛇管到检测仪器的输送出现迟滞或产生死时间。此法简便且易于进行原位灭菌。但当系统校准时，由于气体中氧浓度远低于液体中与之相平衡的氧浓度，使得惰性气体的流动对校准产生很大影响。

在第二种方法中，质谱仪探头的膜可将发酵罐内容物与质谱仪高真空区隔开。除了溶氧的检测外，质谱仪探头和导管法通常可检测任何一种可跨膜扩散的组分。

最常用的溶氧检测方法是使用可蒸汽灭菌的电化学检测器。两种市售的探头是电流探头和极谱探头，二者均用膜将电化学电池与发酵液隔开。对于溶氧测定，重要的一点是膜仅对 O_2 有渗透性，而其他可能干扰检测的化学成分则不能通过。

O_2 通过渗透性膜从发酵液扩散到检测器的电化学电池，O_2 在阴极被还原时会产生可检测的电流或电压，这与 O_2 到达阴极速率成比例。需要指出，阴极检测到的实际是 O_2 到达阴

极的速率，这取决于它到达膜外表面的速率、跨膜传递的速率以及它从内膜表面传递到阴极的速率。如果忽略传感器内所有动态效应，O_2 到达阴极的速率与氧气跨膜扩散速率成正比，而且与氧从发酵液扩散到膜表面的速率相等，膜表面的扩散速率与氧传质的总浓度驱动力成比例。假定膜内表面的氧浓度可以有效地降为零，则扩散速率仅与液体中的溶氧浓度成正比，从而使探头测得的电信号与液体中的溶氧浓度成正比。

实际发酵操作中，有必要对探头进行校准。通常在灭菌前，根据零位及最大饱和度的值，在反应器中进行原位校准。通过发酵培养基预先的 N_2 脱气来校定零位，最大值通过充入空气使培养基中氧饱和来校定。由于探头的电输出读数取决于氧的扩散传质速率，在已知气体中氧平衡分压与发酵液的实际溶氧浓度之间的亨利定律关系已知的条件下，可推导出发酵液中溶氧的真实浓度。因此探头实际上检测的是氧平衡分压，而不是直接检测溶氧浓度。在实际发酵培养基中对探头进行校准是很重要的。探头实际上检测的是传质速率，因而需在与发酵过程相同的流体动力学条件下进行校准，而且溶氧探头应能耐受灭菌。很明显，最好在发酵开始前在发酵罐中进行校准。通常采用线性校准，包括零位和斜率的调节。

零点是在向发酵罐中充入大量的 N_2（不含 O_2）后设定的，最好在灭菌后立即进行，因为灭菌过程中已除去大量可溶性气体。但是，大多数溶氧探头在零点氧（不含氧）时的输出值接近于零电位，因此无须进行零点校准。但是，当读数在极低的溶氧张力下设定时，需将探头的一根导线断开，将电流设置为零。如果需要在实验后检查校准零点，简便方法是，将少量连二亚硫酸钠加到发酵罐中，使其和氧迅速发生化学反应。但要注意，这种物质也会杀死细胞，所以应在实验结束后使用。

其他需要校准的参数包括斜率、灵敏度、满刻度和量程等。应该在接种之前、发酵罐大量充气后校准以上参数（搅拌，在操作温度下进行）。校准后可以给出空气的饱和度，溶氧计设定为可读取 100% 的溶氧张力，或者是适当的分压计算值。

使用溶氧探头时，对读数产生影响的有 3 个物理参数：搅拌、温度和压力。下面分别介绍其对读数的影响。

1）搅拌的影响：由于溶氧探头在工作中存在明显的电流，自身消耗大量的氧。探头的信号与氧向电极表面传递的速率成比例，而氧的传递速率则受氧跨膜扩散速率控制。这一速率与发酵液的浓度成比例，其比值（以及探头的校准）取决于总的传质过程。探头的一般工作条件是，氧向膜外表面的传递速率很快且不受限制。因此，整个过程受跨膜传递的限制，比例常数（传质系数）较易维持恒定。发酵实验时，搅拌操作可以获得满意的跨膜传递速率。需要指出，在对探头进行最初校准的过程中，必须对发酵罐进行搅拌。

2）温度的影响：溶氧探头的信号随温度的升高而显著增强，这主要是因为温度影响氧的扩散速率。发酵实验过程中须控制发酵罐的温度，因为即使 0.5℃左右的温度变化，也会使探头信号发生显著变化（ >1% ）。溶氧读数的周期性变化（每隔若干分钟观察 1 次）显示了温度波动的影响，而且较大的温度变化能引起校准的较大漂移。因此，在实验过程中改变温度控制时要格外注意。在对发酵罐的操作温度进行控制以前，须对溶氧探头进行校准。考虑到上述影响的存在，一些溶氧探头带有温度传感器等仪表，用以实现自动温度补偿。此外，对于具有计算机监控的发酵罐，可利用来自独立的温度传感器的信号，由相关软件实现温度补偿。

3）压力的影响：压力变化会影响溶氧探头的读数，尽管这实际上反应了溶氧的变化情况。探头的响应主要由溶液的平衡氧分压确定。读数通常表示为大气压下空气的百分比饱和

度，100% 的溶氧张力（DOT）约相当于 21.28kPa（160mmHg）的氧分压。如果发酵液的平衡气体总压发生变化，即使气体组分未发生变化（因为氧分压会按比例改变），也会改变溶氧探头的读数。

7.6.3　生物反应过程控制

1. 生物反应过程控制系统　生物反应过程控制是根据对过程参数的有效检测及对过程变化规律的认识，借助于由自动化仪表和计算机组成的控制系统，对一些关键参数进行控制，从而使生物反应过程正常、高效地进行。生物反应过程控制一般包括 3 个方面的内容：

（1）对生物反应过程的未来状态及目的产生影响的参数进行控制，如温度、pH、生物量等；

（2）选择性的控制操作，如阀门的开、关，泵的开、关等；

（3）控制模型的建立，通过模型可以预测控制操作对生物反应状态产生的影响。例如，在通过调节基质的加入浓度和速率来对细胞生长速率进行控制之前，需要建立一个能够反映其相互关系的数学模型。

在标准的搅拌式发酵罐中，可以检测的过程参数有：反应器中内容物的质量或体积，搅拌器的速度、功率和转矩，氧化还原电位，CO_2 浓度，气体流率，进料量，以及尾气中的 O_2 和 CO_2 浓度等。这种设备上一般配置的控制元件有：温度、pH、溶氧控制元件和消泡元件。目前常用的控制系统如图 7-18 所示。

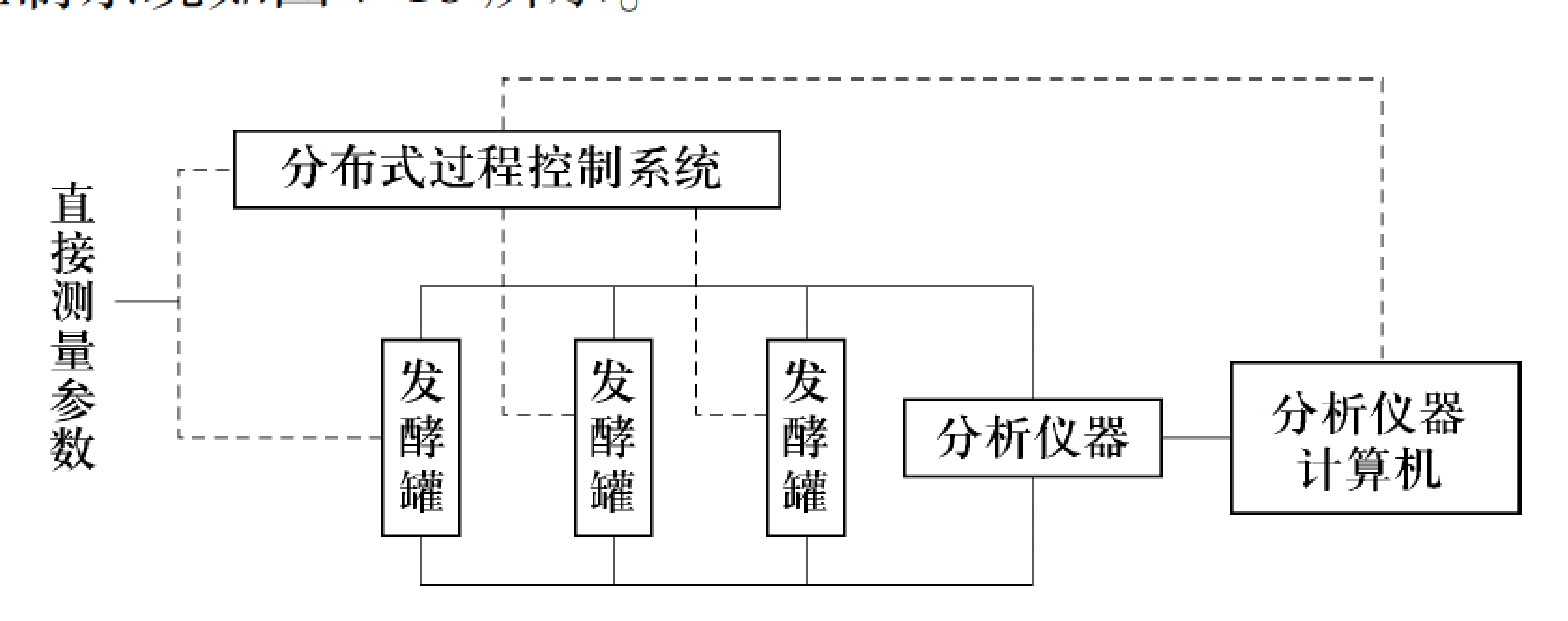


图 7-18　生物反应过程控制系统示意图

配有计算机的发酵过程控制系统可对多个发酵罐同时进行控制。通过计算机控制取样装置，分别对多个发酵罐的发酵液和尾气的组分进行自动分析，分析结果由分析仪器直接传送到监控计算机，监控计算机按照预先设置的程序对这些数据进行分析和处理，并以图形或表格的形式显示出来，以便于操作者对发酵过程进行优化控制。在这一过程中，监控计算机所起的作用有以下几点：①发酵过程中数据的采集和存储；②将存储的数据用图形或表格的形式显示出来；③对存储的数据进行各种分析和处理；④与检测仪表和其他计算机系统进行通信；⑤对模型及其参数进行识别和判断；⑥实现复杂的控制算法。

监控计算机应具有尽可能完善的功能和较高的可靠性、一定的升级能力、简单的运算能力、与其他系统进行通信的能力等。

2. 检测生物反应过程参数的传感器系统　除生物反应器的主体设备以外，传感器在生物反应过程的控制过程中起着重要的作用。每个传感器均需要与之配套的变送器，用于将传感器获得的信息转换成明确限定的输出信号，这种信号是与发酵系统相联系的。有时可将传感器和变送器安装在同一检测设备上。为适应自动化控制的要求，应尽可能使用各种适合的传感器来进行生物反应过程参数的检测。传感器的有关内容已经在 7.6.2 小节作了详细介

绍，以下仅简要介绍生物反应过程设备中用于检测控制的变送器、执行机构及变频器。

1）变送器：除了用做检测装置以外，传感器也常用做特定电路（如惠斯通电桥、放大器等）的组成部分，从而将电路的输出信号与发酵系统联系起来。这种控制仪器被称为变送器。

传感器的信号传递分为两种情况，即敏感元件到变送器的信号传递和变送器到二次仪表的信号传送。对于前一种情况，主要考虑敏感元件拾取的信号在传递中受导线电阻的影响，比如热敏电阻较大，信号传递的距离较近，导线电阻的影响可以忽略不计时，用二线式传递即可；如果热敏电阻较小，信号传递的距离较远，则必须考虑导线电阻的影响，此时，须采用三线式或四线式信号传递方式，以消除导线电阻的影响。对于后一种情况，传递的信号可分为电流信号和电压信号。如为电压信号，除了传递信号的两根线以外，还需要两根电源线，故称之为四线式。如为电流信号，只要两根导线就够了，故称之为二线式。由于电压信号易受导线电阻和干扰信号的影响，因而多采用电流信号传递，即二线式传递方式。

实际应用过程中可将变送器看成是一种黑箱。为了易于在发酵设备与发酵系统间进行灵活的连接，推荐使用标准输出信号。

（1）连续的模拟信号和周期性输出信号：0～10V（直流电）或0/4～20mA（直流电）。为了避免接地操作带来问题，这种输出信号须能够进行浮动。

（2）BCD输出信号应由标准的RS-232、RS-423或IEEE 488接口及其通信协议进行变送。

2）执行机构：它是发酵设备的一个元件，能够改变响应于控制器的输出信号或人工操作的监控参数的值。此处，仍推荐使用标准输出信号。必要时可用变频器将这些信号转换成执行机构的适用信号。执行机构可以连续运转（如对阀门、电动机或泵的速度进行控制），或者间歇式运转（如阀门的开/关、泵的开/关）。

3）变频器：它将传感器的输出信号转换成执行机构适用信号的一种转换电路。传感器中使用的变频器主要有以下几种。

（1）电压－电流转换电路：将直流1～5V的电压信号转换成以电源负端为基准的直流4～20mA电流信号。

（2）电流－电流转换电路：将0～10mA的电流转换为4～20mA的电流，或将输入的直流4～20mA电流信号转换为直流0～10mA输出。

（3）电荷－电压转换电路：根据操作原理，可将传感器分为电压变化型、电流变化型、及介于两者间的中间型。其原理在于运转过程中有电荷产生，电荷－电压转换电路直接将电荷变换成电压信号，方便了信号处理。

（4）电阻－电压转换电路：将电阻信号变换成电压信号。

（5）电压－频率转换电路：将电压信号变换成频率信号。

（6）电容量－脉冲率转换电路：是一种能将电容量形式的信号变换成脉冲率形式的信号的变换电路。

（7）脉冲率－电压转换电路：当传感器远离系统主体时，传感器输出信号需进行长距离传递，以电压、电流等表示的输出信号在电缆中作长距离传递时，会受电缆自身的阻抗、电容、绝缘性等引起的损失和外部噪声干扰的影响，以数字形式进行信号传递则可避免这些影响，频率信号即为一种数字形式的信号。因此，用脉冲变电器即可容易地进行隔离处理，从而实现信号的长距离传递。

3. 生物反应过程中重要参数的控制方法与技术

1）温度控制：生物反应的适宜温度范围通常较小，发酵过程常需将生物反应器的温度控制在某一定值或一定的范围内：对于小型发酵罐温度控制系统，采用以发酵温度为被控制（被调）参数，冷却水流量为控制（调节）参数的简单 PID 单回路控制方案；对于大型发酵系统，则采用发酵罐温度为主回路（主参数），以冷却水系统为副回路（副参数）的串级控制方案。

发酵罐的冷却和加热通常由 PI 或 PID 控制器进行控制。当发酵罐的容积较小时，可采用时间比例控制器进行控制。在充分搅拌的条件下，可以用简单的开/关控制器或 PID 控制器对温度进行控制。

实验室规模的发酵罐常应用简单的开关控制，PI 或 PID 为时间相关的控制，其中有效的加热或冷却时间由控制算法来调控。双向加热和冷却作用可对小型发酵罐实现精细的控制，可将温度变化控制在 ±0.2℃范围内。规模较大的工厂可完全采用 PID 控制，需要使用蒸汽和冷却水控制阀，当然须避免同时加热和冷却。万一控制器失灵，须关闭蒸汽阀，同时打开冷却水阀，以使反应器处于安全状态。控制阀装有旁路设备，可确保最初的加热或灭菌后的冷却快速进行。有时罐中搅拌器产生的热量足以对发酵液加热，这种情况下无须加热，只需冷却即可实现良好的控制。

在实验室规模的玻璃发酵罐中，温度可由红外灯（加热）和冷却蛇形管（冷却）来控制。由于系统对红外加热的响应较快，因而这种开/关控制器的控制精度通常较高，但在冷却过程控制时效果不好。冷却装置可能会造成零点几摄氏度的偏差。如果冷却水系统的压力基本恒定（不需要前馈控制），而冷却蛇形管的冷却能力未超过所需要水平，则无须应用前馈和反馈控制系统进行调节。此外，小型玻璃发酵罐常用控温方法是水浴调节，水通过热交换蛇形管或罐外安装的夹套装置来冷却罐体。有时用安装在不锈钢夹套内的加热器来调控，或者用恒速流动的冷水来冷却。在闭环控制系统中，用于热交换的流体在系统中快速地回流，循环系统的温度可用多种方式进行调控。

对于发酵罐和培养基的灭菌，必须控制灭菌温度和维持时间。由于饱和蒸汽的温度与压强是对应的，因而可通过控制罐压来控制温度。通常在高压下用蒸汽加热至 121 ~ 125℃的方法来进行灭菌，可以通过容器中的蒸汽量或蒸汽压力的调节来对灭菌的温度进行控制。对于实验室规模发酵罐，常用半导体温度计或水银触点温度计作为温度检测和控制用温度计。对于生产规模的发酵罐，常用铂电阻温度计和半导体温度计。为了防止染菌，所用温度计须能够耐受高温蒸汽灭菌，应安装在可与发酵液相接触的位置。

2）pH 控制：pH 是微生物生长的一个重要环境参数，生物反应器内最适 pH 的范围通常很小，因而发酵过程中须对 pH 进行严格的控制。例如，在氨基酸发酵过程中，糖类经历许多酶促反应而转化为氨基酸。在这一系列的酶促反应过程中，起主导作用的酶的最适 pH 会对总体反应速率起着限制性作用，因而通过控制 pH 可以获得良好的效果。

工业生产中，若发酵液的 pH 偏低，可以加氨水使其 pH 回升；若 pH 偏高，在发酵前期可通过适当增加糖的补加量来调整。pH 控制中，必须严格控制氨水的加入量，绝对不能过量。pH 控制中常用开关阀，相应控制方式采用改变开关阀的开关频率和开关脉冲宽度来调节氨水的加入量。

某些发酵过程的 pH 很难控制，主要原因如下：首先，发酵过程中发酵液对酸或碱的添加的响应是变化的；其次，pH 值是发酵液中 H^+浓度的非线性函数（$pH = -\lg[H^+]$）。通

常，微生物细胞在代谢酸性或碱性基质过程中，会产生酸性或碱性的代谢产物或副产物，从而导致发酵液 pH 的改变。因此，必须在发酵过程中根据实际需要，向发酵液中加入适量的酸或碱以维持一定的 pH。

在某些发酵生产中，添加酸或碱性中和剂也起到补充营养的作用，例如谷氨酸发酵，常需流加氨水或通入氨气，可同时起到维持一定的 pH 和补充氮源的双重作用。此外，发酵液 pH 的变化是反映生物细胞生理状态的重要信息，有时可根据 pH 的改变进行基质的自动流加控制。对于许多发酵过程，引起发酵液 pH 变化的原因是作为氮源的 NH_4^+ 浓度的改变。因此，可由 pH 的改变推测微生物细胞的活性状态和基质浓度范围，从而决定氮源及碳源等的添加策略。在实际生产中，常用成分复杂的糖蜜及豆粕等廉价、复合的碳源、氮源等。发酵过程中，氮源被不断地消耗，同时生成醋酸等有机酸，使发酵液的 pH 下降，若用氨水作碱性中和剂，则 NH_4^+ 的消耗成分自动补充。当发酵液碳源耗尽时，微生物细胞依靠有机酸或分解胞内储存物质而维持生命，从而使细胞内的氮成分过剩而向培养液中排泄 NH_4^+。此时若添加碳源，则使 pH 再次下降。这种流加方法对次级代谢产物的生产是有效的。如用放线菌发酵生产硫链丝菌肽时，使用糖蜜和脱脂大豆粉作原料进行发酵，就利用上述的 pH 调控方法而提高产量。

pH 控制实际上是靠控制酸碱的供给脉冲来实现的。控制操作过程如下：当 pH 的检测值大于设定值时，将酸加入反应器；当检测值小于设定值时，则加入碱。这种当 pH 在设定值两侧时的加酸或加碱操作，导致一种双边不连续的对酸或碱进料的校正。P、PI 或 PID 控制可用于调整频率、脉冲宽度和校正速度。

小型发酵罐中常使用开关酸碱泵，即简单的开关控制器。在中试规模，最好应用双向时间比例 PI 控制。有时使用参数死区（dead band）PI 控制器，使发酵罐的 pH 可在上限值和下限值间作小幅度漂移，而不启动控制器的控制作用，酸或碱的控制仅在死区之外进行。死区的宽度可根据过程需要进行调整。开关控制器不能适应发酵液缓冲能力的变化，因而不能用于缓冲能力有明显变化的发酵过程。考虑到积分作用，这种情况下用 PI 控制器较好。据报道双向控制作用消耗试剂最少，这一控制基于时间比例关系原理。在中试工厂，可获得 ±0.03pH 的控制，化学物质的添加通常由恒速蠕动泵实现；为实现精细控制，也常使用变速泵。大型生物反应器的控制，常使用控制阀来调节反应物从加压供应罐进入反应器的流速。图 7-19 为中试规模发酵罐的 pH 控制简图。

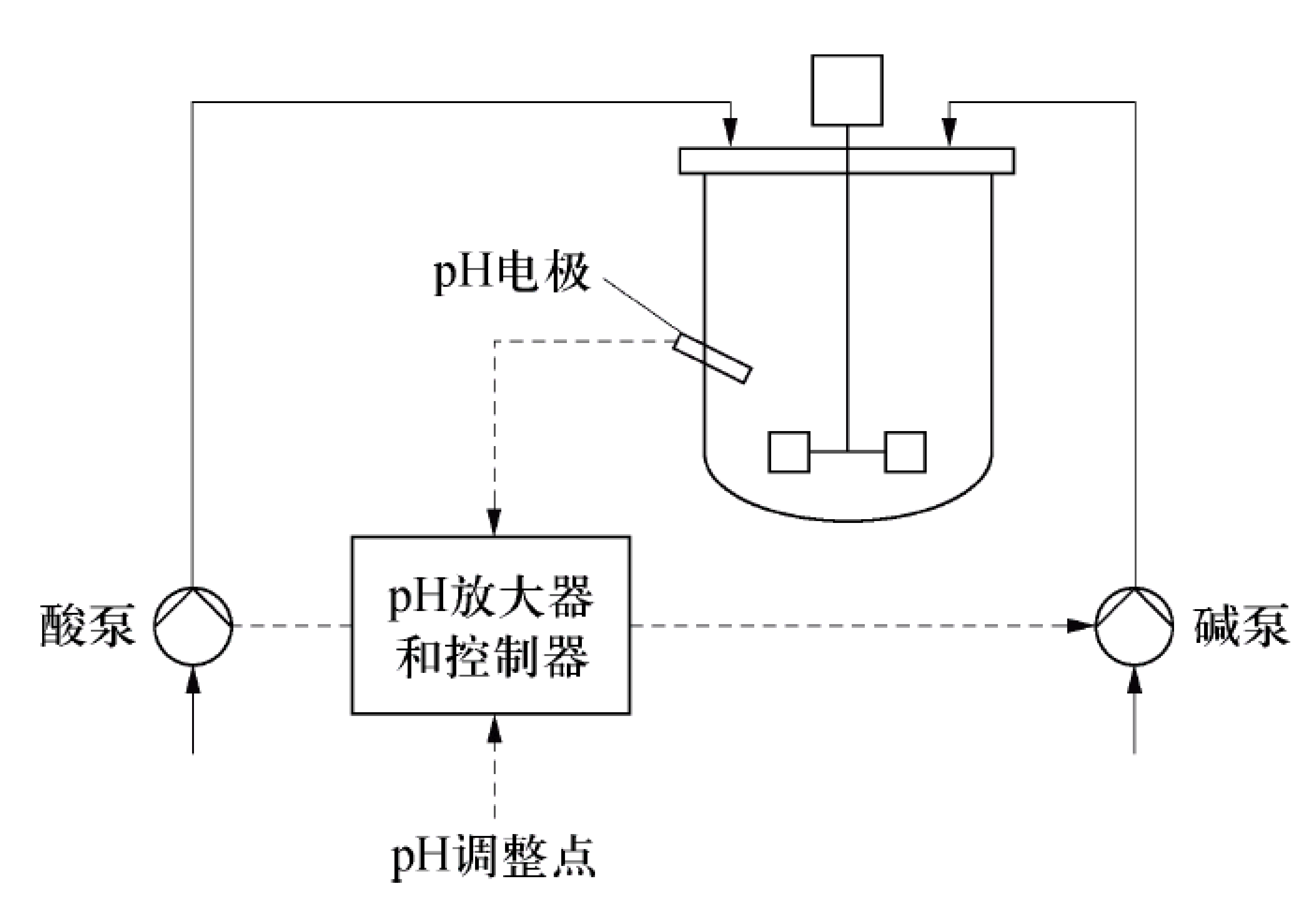


图 7-19　发酵罐的 pH 控制简图

近年来研究人员还开发了自适应 pH 控制器。这类控制器利用一个模型及 pH 对添加酸或碱的响应对 pH 进行自适应控制。大多数 pH 控制器利用死区来避免酸和碱的连续添加。

在发酵过程中，pH 的检测控制采用可耐受高压蒸汽灭菌的 pH 电极。这种电极是一种可置于发酵罐内原位加热灭菌的传感器。将 pH 电极与一滴定器相连，就可以实现模拟控制：当发酵液的 pH 偏离设定值时，滴定器就启动送料泵以送入酸或碱进行调控。当然，应用计算机直接数字控制则更准确。

3）溶氧控制：不同的生物反应对氧的需求不同，反应溶液中溶氧浓度对细胞生长和产物生成具有重要影响，有时甚至会起主导作用。从节能和经济角度考虑，也必须把发酵液的溶氧浓度控制在某一适宜的范围内。影响溶氧的主要因素有供给的空气量、搅拌桨转速和发酵罐压力。多通过调节供给空气量来控制溶氧浓度。

发酵过程中罐内的溶氧浓度由细胞的耗氧速率与气相对细胞的供氧速率之间的平衡确定。可由下式表示：

反应器液体中 O_2 积累速率 = 从空气到液体的 O_2 传递速率 – 细胞耗氧速率

即：

$$V_L \frac{dc_L}{dt} = k_L a[c^* - c_L]V_L - rV_L \tag{7-35}$$

式中：V_L 为液体体积（m^3）；c_L 为液体中溶氧浓度（$kg \cdot m^{-3}$）；dc_L/dt 为溶氧浓度随时间的变化率（$kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$）；$k_L a$ 为总传质系数（s^{-1}）；$c*$ 为气相溶氧浓度相平衡的液相溶氧浓度（$kg \cdot m^{-3}$）；r 为细胞耗氧速率（$kg(O_2) \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$）。

由于 O_2 的溶解度一般很小，与耗氧项和传递项相比，氧的积累项通常很小。因此，合理的溶氧控制取决于上述两项的精确平衡，因为两项的差值的微小变化就会引起 c_L 较大的波动。由于发酵过程中细胞生长速率和耗氧速率变动很大，氧的传递速率需做相应调整，才能保证适宜的溶氧浓度。

用以改变氧传递速率的方式通常有 4 种：①改变搅拌速度；②改变空气流速；③改变供气中的 O_2 含量；④改变发酵的总压力。提高搅拌强度可以提高湍流程度，从而强化质量传递速率。这种方法可提高传质系数，并通过形成小气泡而增大传质界面面积。这些气泡具有较大的比表面积，由于小气泡上升速度较慢，总气持（hold-up）体积增大，总的传质界面面积也增大。增大空气流速对传质系数和传质面积的影响没有提高搅拌强度的作用明显，但可提供更大的传质驱动力。这是因为气相中的 O_2 未全部消耗，使得平衡溶氧浓度 C^* 接近于正常空气的水平。通过直接添加 O_2 来增加空气中的 O_2 含量，或者增加操作的总压具有类似的效果，两种方法均是靠提高气相中的 O_2 浓度来影响 C^* 而增加有效浓度差。实践中通常采用二者结合的方法进行操作，因为如果仅靠调节空气流速进行溶氧控制，不足以在整个发酵过程中将耗氧控制在一个较大的范围之内。

有一种解决方案是，用 3 个控制阀分别控制空气、N_2 和 O_2，在细胞开始生长及随后缓慢生长、耗氧量较小的时期，可向恒定的空气流中加入 N_2 控制流，通过降低 O_2 浓度来减小氧传递速率；当细胞的生长速率较高时，仅对空气流速进行简单调节即可实现控制；当细胞的生长速率极高时，通过调节氧气流，并使其与固定流速的空气流相混合来进行控制。在受控条件下，溶氧探头将信号传递给放大器，经其处理后再传递给三种气体控制器。控制器采用各自的 PID 算法对每一气体控制阀的开孔数量分别进行控制，从而对每种进入发酵罐的气体流率实现控制。

在实际生产中，将空气流和搅拌速度相结合是普遍应用的一种控制方法。控制器首先调节搅拌速度，以满足体系对溶氧的要求。当搅拌转速达到最大值后，控制器开始提高气流速率。组合控制通常采用级联控制，使控制器的输出信号可用于调节搅拌器速度控制器或气流速度控制器的调整点。为了尽可能灵活，理想的控制器应当能在恒定搅拌速度下调节气流速率。

用于研究目的时，一般需要在维持其他条件恒定的情况下改变溶氧浓度，从而研究溶氧浓度对发酵过程的影响规律。但是，这通常很难实现，因为调节搅拌速度或控制气流速率时，也会改变气泡的大小分布、气持体积、湍动水平及细胞的剪切程度。解决上述问题的一种方法就是使用级联控制系统，可在气流中提供额外的氧气以获得有效的溶氧控制；同时向系统中补充氧气，从而保持总气流的恒定。通过这种控制方法，可以将生物反应器的流体动力学条件维持在适当的恒定条件下。

在实际生产中，在经过灭菌以后，由于溶氧探头耐用性和重现性会受到影响，一般很难对溶氧浓度进行控制，原因是流体混合的不均匀性及发酵液的流变学性质的改变会导致反应器内局部发生氧气耗尽。另一问题是，由于电极内需要有足够机械强度且能耐受灭菌的膜，可灭菌电极的响应速度相对较慢。这会导致检测量明显滞后于反应器的实际值，从而有可能导致在瞬变条件下，细胞实际上已遭受氧饥饿，而电极却仍显示其有足够的氧气。

当细胞浓度较低时（如发酵初期），其需氧量较低，故溶氧速率相应较小，较低的搅拌速度和通气强度即可满足需要。对于好氧性微生物发酵，在消耗糖等碳源的同时也要消耗溶氧。在间歇发酵中，随着微生物细胞的生长繁殖与代谢产物生成，碳源浓度逐渐下降；当碳源被耗尽时，系统的耗氧速率降低，溶氧浓度就会急速上升。此时，若及时补充碳源，可使溶氧恢复正常水平。因此，可通过溶氧的检测控制来调节碳源的流加，碳源可以是葡萄糖，也可以是其他糖类。但此法有一缺陷，就是必须在发酵过程中让碳源耗尽时溶氧才能急速上升，这样就会使细胞无法在最佳的环境下生长与代谢。为此，有人提出了将指数流加法与定期让碳源耗尽措施相结合的工艺，以使碳源浓度降低至零的频率大为下降，从而有利于发酵过程的进行。另外，应用此结合法，还可克服指数流加法有时会造成碳源过量流加的缺点。上述两种控制方法中发酵过程的碳源基质和溶氧的变化如图 7-20 和图 7-21 所示。实际上，溶氧控制可通过调节通风量、搅拌速度来实现。当然，当微生物细胞密度较高时，由于其呼吸和代谢的需氧量较大，常使培养液的溶氧浓度几乎为零。若发现供氧速率无法满足需氧量时，可考虑优化发酵罐的设计或应用溶氧速率更高的反应器类型，或用富氧空气代替普通空气。

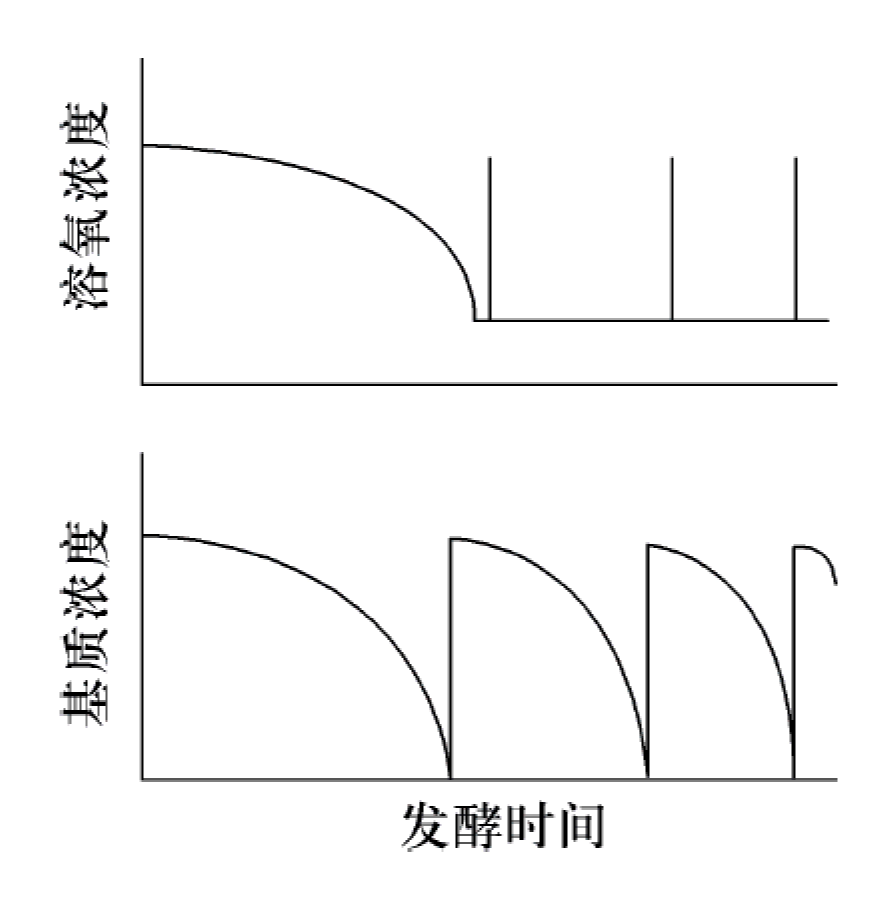


图 7-20　以溶氧变化进行的间歇流加控制过程

控制溶氧不仅是为了研究其对发酵过程的影响，更是为了尽量提高发酵的产率。图 7-22 为溶氧的级联控制示意图。溶氧控制可通过控制发酵罐的 4 种参数来实现，即气流、压力、搅拌速度及氧气/惰性气体混合。其中任一参数的控制均可由常规的 PID 控制实现。当然，某些发酵过程中细胞生长速率和 k_La 的快速变化会给控制带来一些困难。可将相关控制方法结合起来使用，以便计算机控制。可以编写程序来协调使用各种方法，将参数限定在设备的允许值内，补偿溶氧张力对搅拌速度的非线性响应，并且在发酵过程中运行预置的溶氧张力曲线。

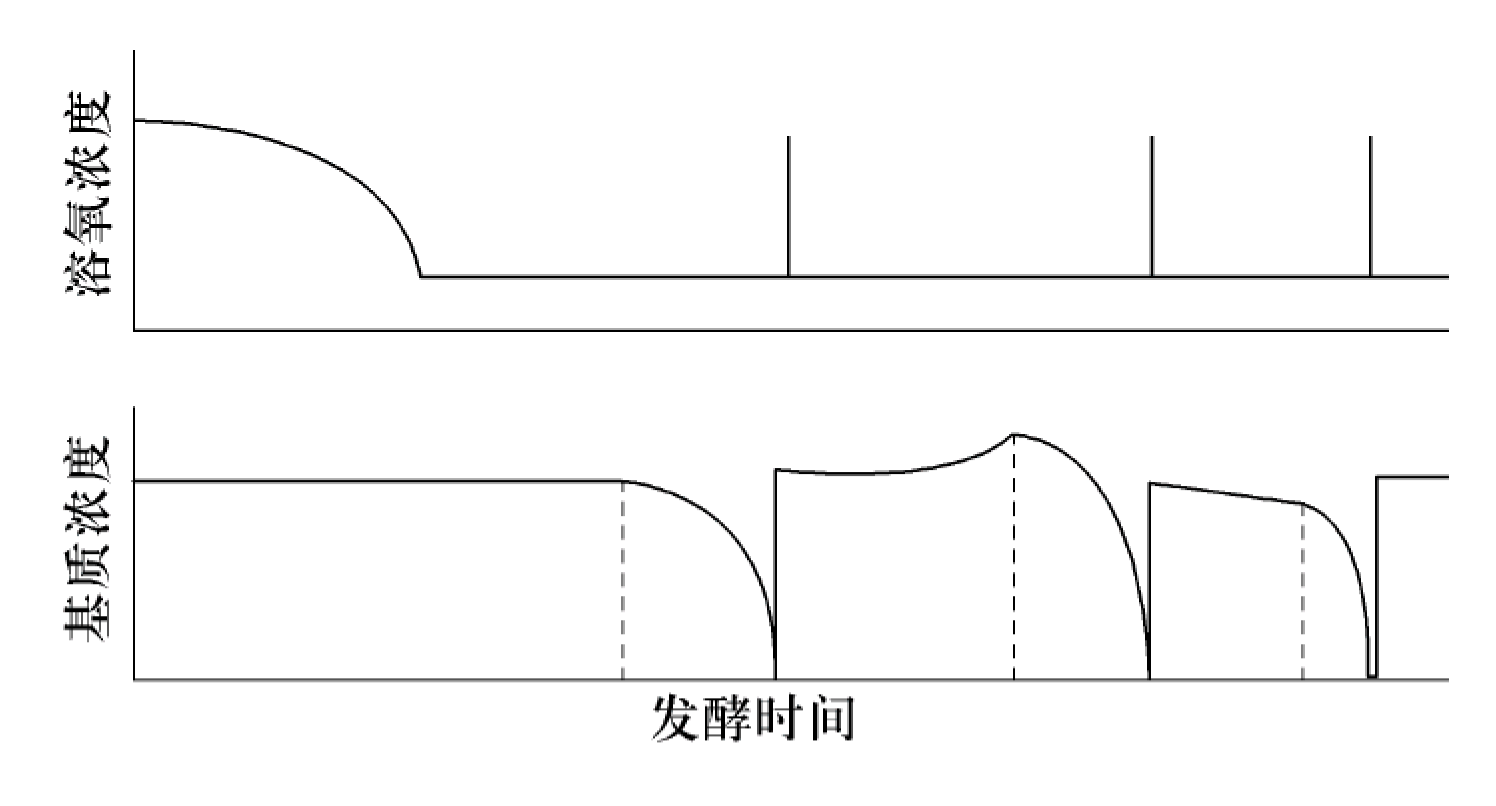


图 7-21　基于溶氧浓度变化的指数流加联合间歇流加控制过程

4）气流控制：如果发酵罐需进行尾气分析，就需要对气流进行精确的检测及控制。在计算微生物特定的氧气摄入量和 CO_2 排放量时，要用到该气流值。气流通常用连接在玻璃管式流量计（转子流量计）上的针形阀来进行手动调节。这种情况下，可以通过改变阀两侧的差压和温度来改变气流。也可购买一种流速调节器以获得较为恒定的气流。

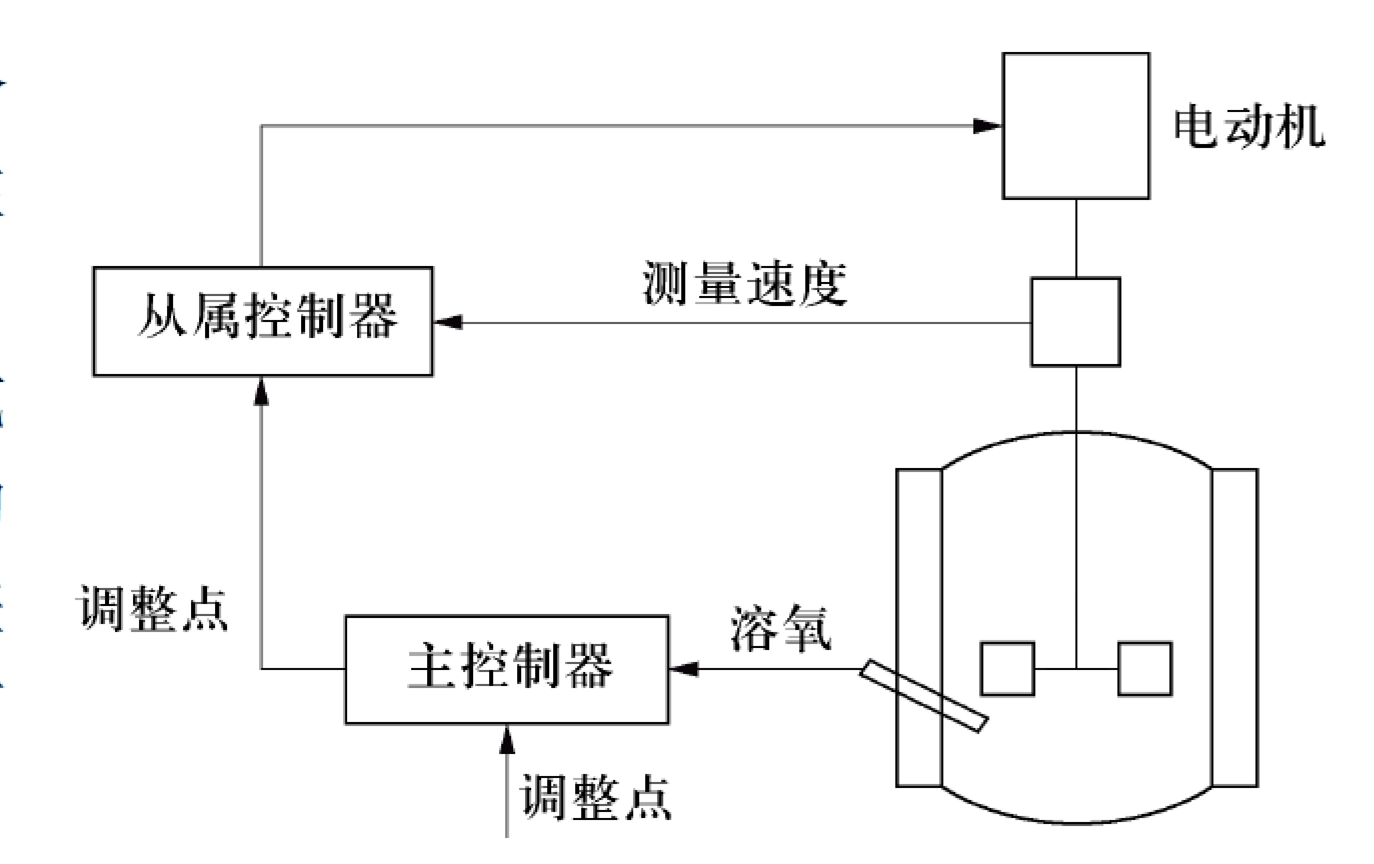


图 7-22　溶氧的级联控制示意图

气流控制最好应用自动控制（反馈回路），但对于小型发酵罐，自动控制较为昂贵，但如果需要实现精确控制，必须应用自动控制。该装置的电子输出信号需要进行数据记录。为小型发酵罐提供气流的电子输出信号的控制装置，需进行经常性的仔细校准。热质量流控制器常用于小型发酵罐的气流控制。

5）压力控制：发酵罐操作压力的变化会引起发酵液中氧分压的改变，即影响溶氧浓度的变化。通常通过调节尾气量来控制发酵罐压力。一般采用简单的单回路 PID 控制方法。出于安全考虑，可加压的发酵罐必须安装机械压力表。如果需要压力的电子输出，通常需要膜片式应变计和变送器，它们对于小型发酵罐是可靠的，但比较昂贵。手动针形阀可用于发酵罐出口，以保持发酵罐的反压力。为了保持压力恒定，需要经常对针形阀进行调节。压力调节器可以提供更为恒定的反压力，但发酵罐上的调节器容易堵塞，不利于卫生设计。最好采用一个由压力变送器、PID 控制器、罐出口管上的气动式气流控制阀组成的控制回路。

6）搅拌控制：要对搅拌器的搅拌速度进行可靠且精确的控制并不容易。通常，市售的发酵罐的电动机通常安装模拟转速计，但它只能对转速进行近似控制。精确的方法是采用控制回路进行控制，控制回路具有一个读取发酵罐轴转速的频率传感器和电动机驱动的反馈控制装置。小型直流电机便宜且易于实现控制，但在连续使用中不够可靠。可以采用交流速度控制器和电动机，经济而有效。如前所述，调节搅拌器速度是控制发酵罐中溶氧张力最简单的方法。为此，电动机速度控制器上具有调整点输入接口是很重要的，这有时被称做外部或远程调整点控制，这一输入可由溶氧控制器的输出进行设定。

7）发酵液容积控制：测量发酵罐中发酵液的体积只是对其实际量的粗略测量，因为发酵液中滞留有变化或恒定量的空气。更为准确的方法是测量发酵液的质量，可以由测得的发酵液的静压头推算，或直接将罐置于称重传感器上，这种方法最为精确。

在补料分批或连续操作过程中，控制发酵罐中发酵液含量是必要的。尽管存在问题，仍常用控制体积的方法，例如在发酵液表面设置导流堰或虹吸管可实现这一控制。如果罐置于称重传感器上，那么质量就是能开关发酵液排出泵或排水阀的控制器的输入信号。如果进料流速很慢，可以手动控制发酵液的排出，这常用于一些次级代谢产物的发酵过程。

8）进料控制：发酵罐进料的检测和控制是重要的，但一般较难实现。由于很少进行固体的无菌添加，此处仅考虑液体进料。如果进料泵用于添加液体，则需要对泵进行校准，以便准确测定进料流速。对于小型无菌进料泵，其校准和流速的设置均不够精确，发酵过程中常发生校准漂移的现象。为了精确测量进料速度，应从可称重的储罐中泵取进料来进行测定，质量需要进行非常精确的测量。储罐进料的质量可用于反馈控制回路，以调节泵的进料速率，从而准确地提供所需量的进料，计算机程序控制可完成这一工作。

一般使用蠕动泵将液体泵送到实验室规模生物反应器中。可使用开环控制器来控制液流，将泵的速度手动调节到所需液流的设定值。通过事先的校准步骤，液体流速与泵速度呈函数关系。为了达到质量平衡，可在实验前后对给料罐进行称重。然而，即使是在一些简单的应用中，进料率也经常会出现反常。对于程序进料（如时间关系曲线），在充足的时间间隔内测定液体的流速并调节其调整点是非常重要的。有人发明了一种流量控制器，它用分析天平作为流量检测器。从一个大贮罐不断地向给料罐中填装料液。流量可由 PI 控制器等进行控制，但是需要减去两个离散的值才能对流量加以确定。取样频率的不同及流量的变化可能会超出可以接受的程度。这一问题可由自适应控制算法解决。

发酵生产中最常用的基质是糖，例如在氨基酸发酵过程中，若初期的糖浓度过高，则菌体生长缓慢，所以必须检测控制基质糖的浓度。为了使发酵过程中维持一定的糖浓度，常用反馈控制糖添加的方法，从而达到控制发酵过程基质浓度的目的。虽然检测糖浓度的传感器一般不能进行蒸汽加热灭菌，但可使用无菌取样系统与高效液相层析仪（HPLC）连接，从而在线测定糖等基质的浓度。对于挥发性基质如乙醇等，可用微孔硅胶管连接气相色谱仪进行在线检测。测定基质浓度有利于实现发酵过程的反馈控制和优化控制。

发酵工艺技术人员与自动控制人员一起共同研究，试图找出好的补料方法和策略。如基于尾气 CO_2 的释放率、化学元素平衡法来调整补料量，或用控制呼吸商的方法来控制补料，但如何控制好中间补料仍有待进一步研究。

9）泡沫控制：为控制发酵过程（尤其是通气发酵）中的泡沫，常使用化学消泡剂和机械消泡器。常用的消泡剂有天然油脂、聚醚类（泡敌的主要成分）、高级醇和硅酮等。对于泡沫不多且不难消除的场合如乙醇发酵等，可使用消泡剂除泡而无须机械泡沫破碎装置。但对于泡沫多且较难消除的发酵过程，则应将消泡剂与机械消泡器结合使用。同时应根据发酵液的性质，通过试验确定化学消泡剂的种类和用量。当然，机械除泡也需根据发酵罐的类型和发酵液泡沫特点来确定其选型及相应的设计。发酵工业生产中常采用双位式控制方法，当发酵液液面达到一定高度时，自动打开控制消泡剂的阀门；而当液面降回到正常时，自动关闭阀门。

7.7 生物反应器的放大

生物反应器的放大指将实验室研究设备中的优化培养或发酵结果转移到工业规模的生物反应器中加以重现的技术。生物反应器的放大是生物技术开发过程中的重要组成部分，也是生物技术成果实现产业化的关键之一。

生物反应器放大过程涉及培养–发酵环境与细胞形态学、细胞生理学和过程动力学之间的关系。培养–发酵环境又与生物反应器中的流体力学性质、传递现象（热量和质量传递）和培养–发酵液的理化性质有密切关系。由于细胞的种类不同，其形态与生理特性差异很大，致使培养–发酵液的理化性质相当复杂，常随时间变化，加上培养–发酵过程中以活细胞作为生物催化剂。而活细胞的代谢途径以及遗传特性对环境的影响十分敏感，这样，生物反应器的优化实质上是环境的优化，生物反应器放大的关键在于能把实验室反应器的优化环境成功地转移到工业反应器中。

目前，生物反应器的放大既有费时、费钱的逐级经验放大法，也有理论方法，既有不少成功的实例，也有较多失败的教训：中国维生素 C 的两步发酵过程正在使用单台容量为 200 ~ 300m^3 的气升式反应器，国外生产乙酸的塔式反应器的单台容量已达到 1000m^3，酵母单细胞蛋白的单台塔式反应器容量达到 2000m^3；动、植物细胞的产业化仍然面临反应器放大问题，对有些工程菌的高密度培养，生物反应器的传质与混合性能并不能很好地达到要求。生物反应器的开发正在向大容量和自动化方向发展，而这对反应器的放大方法和基础理论研究提出了更高的要求。

7.7.1　放大对细胞代谢的影响

在小型实验室发酵罐（如 5 ~ 20L 发酵罐）进行发酵过程研究时，通常可以认为发酵液得到充分的混合，营养物质（包括溶氧）、菌体及代谢产物是均匀分布的，它们的浓度在各处都相同。然而在搅拌不很剧烈、混合不太充分的情况下，即使在小型发酵罐中也会存在物质浓度的差异。例如研究人员研究了搅拌转速为 200$r \cdot min^{-1}$ 的 2L 发酵罐中模拟发酵液混合的均匀程度。在发酵罐中加入碱性磷酸酯酶和底物对硝基苯酚磷酸酯，通过测定模拟发酵液的光密度变化，即可确定碱性磷酸酯酶活力。当 pH 分别调节为 4. 75 或 4. 00 时，酶活力都很低，如果在发酵液中插入一对铂电极并加上 5V 直流电压，由于电解作用，在一个电极附近会产生酸，使局部 pH 下降，而另一电极附近产生碱使局部 pH 上升，但不引起整个模拟发酵液 pH 的变化。这样通过电解作用局部改变模拟发酵液 pH 时，碱性磷酸酯酶的活力明显提高，显示了局部发酵液 pH 升高的影响，不过在此系统中培养酿酒酵母时，对酵母的生长并没有明显影响。

在小型发酵罐中进行补料分批发酵，如果搅拌转速过低或补入的料液较浓，也很容易发生料液混合不均匀的情况，进而引起微生物代谢的变化。在 5L 发酵罐中进行基因工程菌 W3110 发酵时，搅拌转速和流加的葡萄糖浓度对菌体生长与乙酸合成有重要影响。在搅拌较差或流加葡萄糖浓度较高的情况下，都有较多乙酸产生，同时菌体的生长也较差。这是由于加入的葡萄糖不能迅速混匀，在葡萄糖进入发酵液的区域具有较高浓度，大肠杆菌对局部区域的高浓度葡萄糖迅速反应产生乙酸，从而造成乙酸积累和大肠杆菌生长变差。可以预料，这样的过程在放大时，对混合的要求将是非常高的。

随着发酵罐规模的扩大，发酵罐中物质的分布很可能是不均匀的，从而引起发酵最终结果的差异。例如，研究人员发现在 10L 发酵罐中以补料方式分批发酵的方法生产面包酵母时，酵母对糖蜜的得率要比在 215m^3 鼓泡式发酵罐中高 7%，不过培养所得的酵母菌产气能力则略低。在大肠杆菌发酵生产重组蛋白时，反应器从 3L 扩大到 9m^3 时，菌体对葡萄糖的得率下降了 20%。与 5L 发酵罐进行的大肠杆菌发酵相比，20m^3 发酵罐中菌体的得率低，但细胞的死亡率也低。

大型发酵罐中的溶氧分布也不均匀，在带有多个搅拌桨的发酵罐中，特别是当发酵液比较黏稠时，发酵液中的溶氧分布会有明显差异。图 7-23 是在一个 19m³ 发酵罐中用一可移动的溶氧电极测定的溶氧分布，发酵罐中不同高度、不同径向位置的溶氧有明显差别。

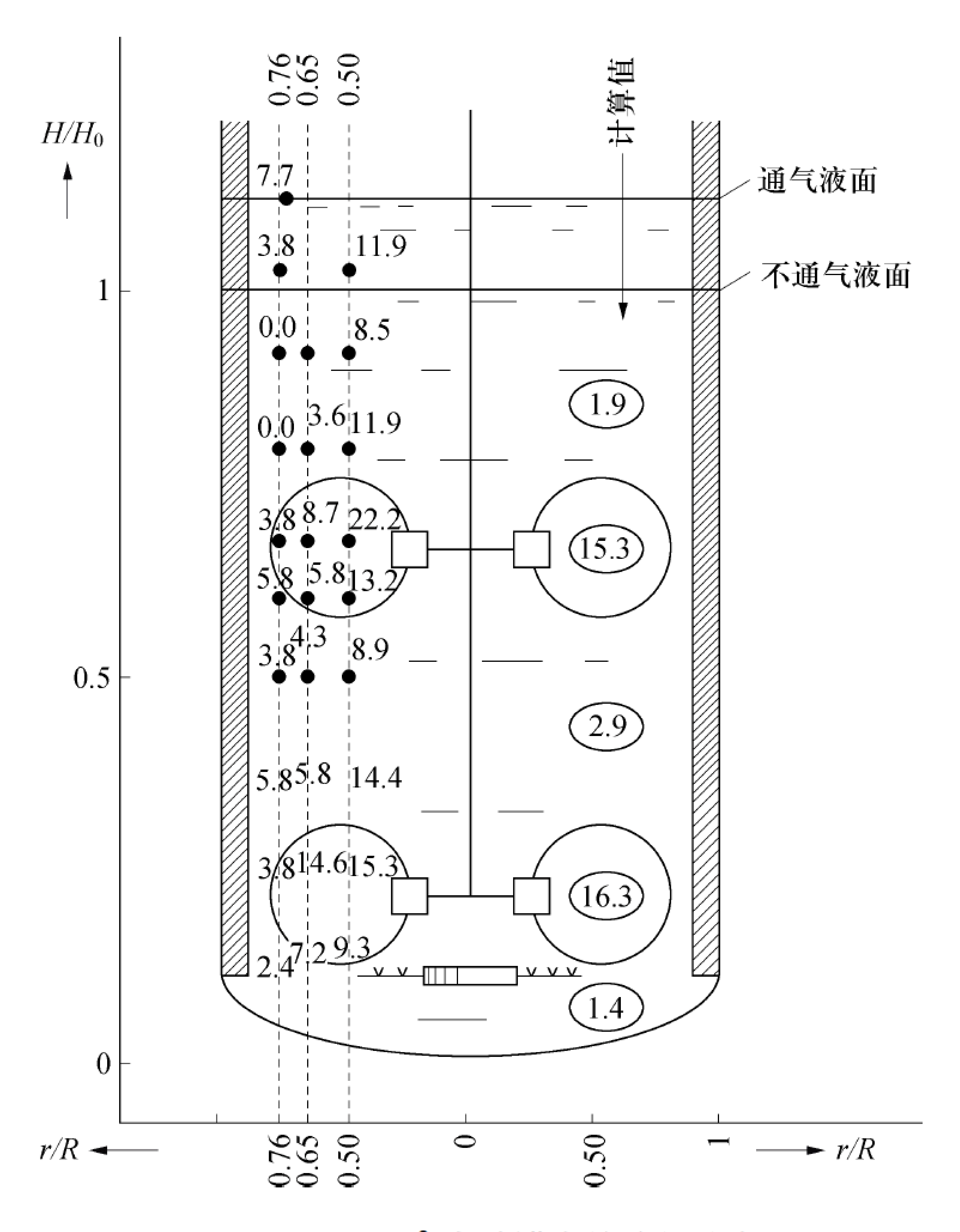


图 7-23　19m³ 发酵罐中的溶氧分布

其中 R 为发酵罐的半径，r 为溶氧电极距搅拌轴的径向距离，H_0 为发酵罐内未通气时的液面高度，H 为溶氧电极的实际高度

图 7-24 是安装有 4 个标准涡轮搅拌桨的 22m³ 发酵罐中培养大肠杆菌过程中菌体生长和溶氧变化，发酵罐中安装了 2 支溶氧电极，一支在中部，一支在底部，可以看到 2 支电极所在部位的溶氧有明显差异。在这样的发酵罐中，菌体周期性地经历高溶氧和低溶氧（或高底物浓度和低底物浓度）的环境，从而影响其代谢。

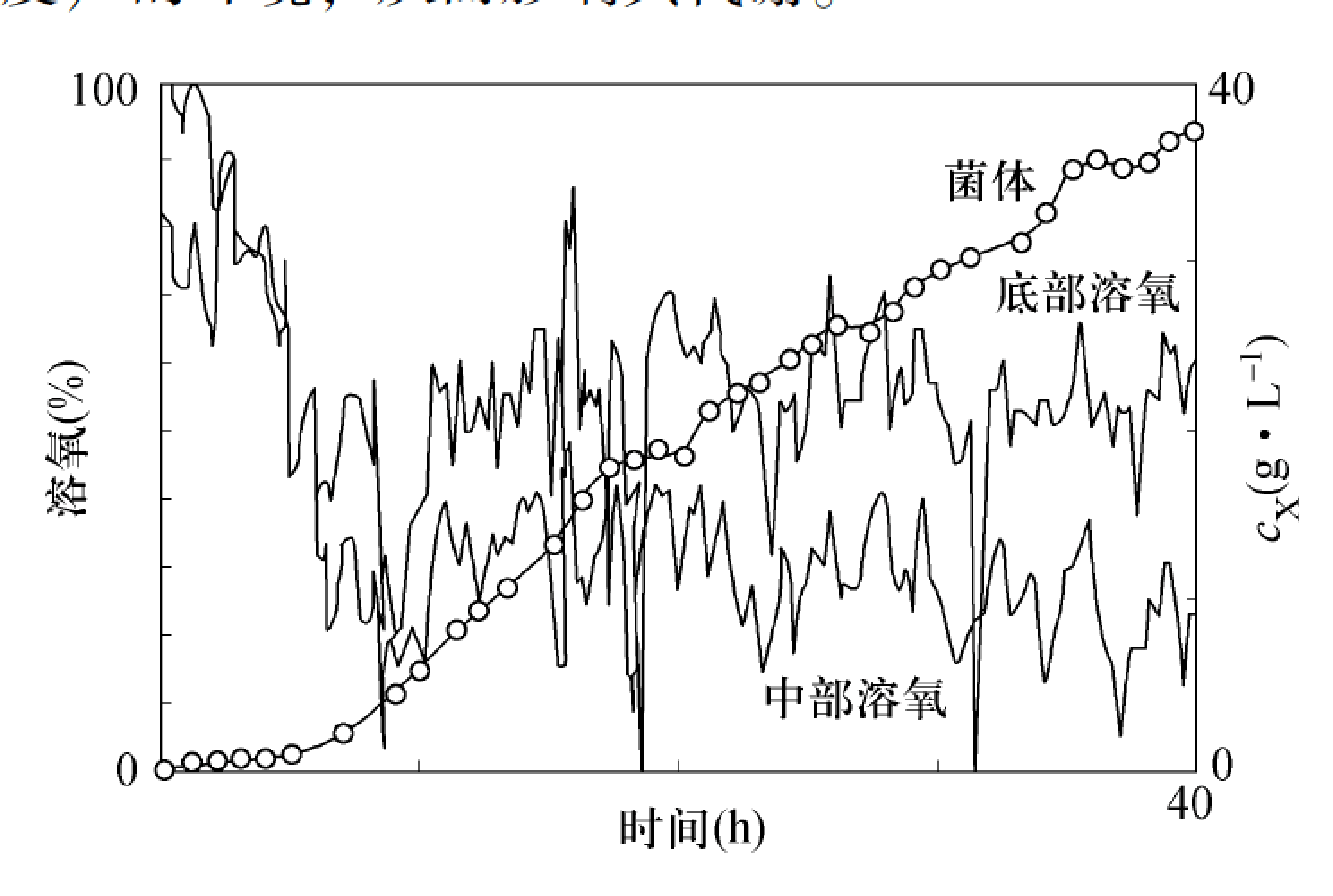


图 7-24　22m³ 发酵罐中大肠杆菌发酵中菌体生长和溶氧变化

因此，大型发酵罐中的混合是影响发酵效果的关键因素之一。在以农副产品为培养基成分的大规模发酵过程中，如果发生混合不均匀的情况，很容易产生隐性营养缺陷的现象，采用轴向流搅拌桨可以改善发酵罐中的混合状态，从而有助于改善生产菌株的隐性营养缺陷问题。

为了研究反应器中的混合状态对发酵的影响，采用混合充分的小型反应器与一带有静态混合构件的管式反应器构成回路，模拟大型反应器中较难均匀混合的情况进行缩小实验（图 7-25）。发酵液在管式反应器中的停留时间为 56s，中部及出口处设有 4 个取样口，进行快速取样和分析测定。由于在管式反应器中不通气，在葡萄糖浓度较高时（葡萄糖补料液直接加到管式反应器进口处）会发生缺氧的情况，因而大肠杆菌会发生厌氧条件下的混合酸发酵，形成乙酸和甲酸。

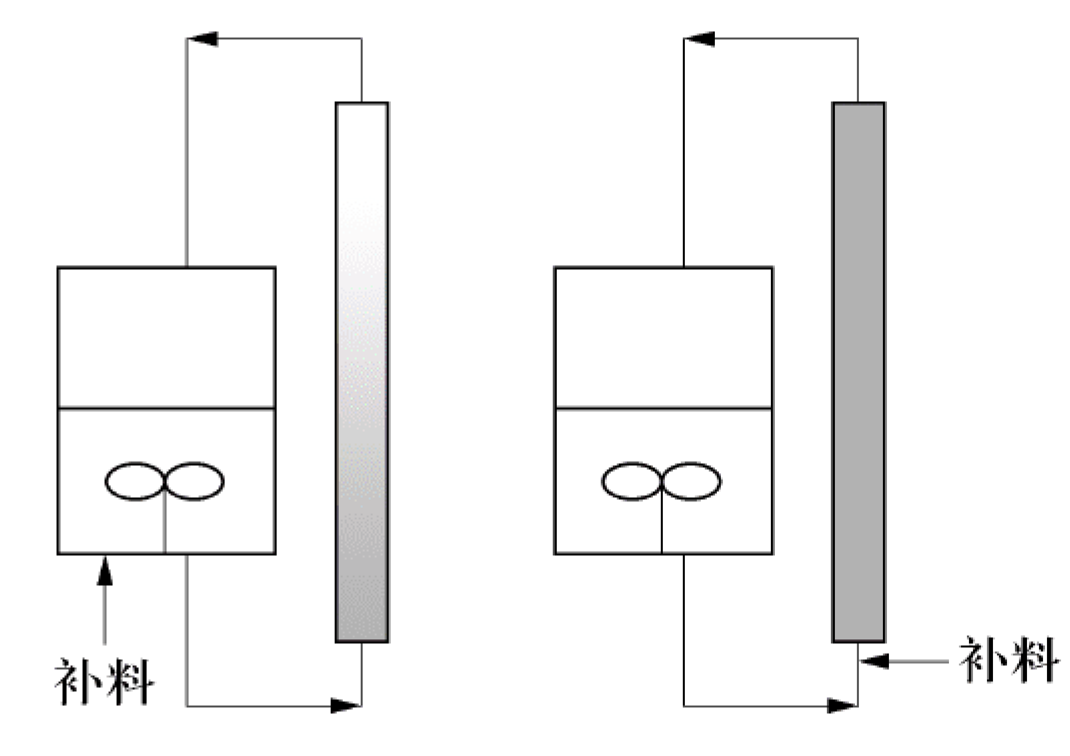


图 7-25　研究大型发酵罐混合效果对细胞代谢影响的缩小反应装置

当管式反应器中的培养液进入搅拌罐反应器后，虽然这些代谢产物可被氧化，但会使菌体对葡萄糖的得率下降。菌体内一些基因（如氧饥饿诱导的 *pfl* 和 *frd* 等）的 mRNA 含量也随管式反应器中的停留时间延长而增加，明显高于搅拌罐内菌体 mRNA 的含量。这表明大肠杆菌对局部较高葡萄糖浓度或低溶氧浓度会马上产生响应，发酵中应尽量减少混合不均的情况。

枯草芽孢杆菌的发酵受到溶氧的影响，其代谢产物 3-羟基丁酮和 2, 3-丁二醇的生成还受 pH 的影响，因此研究人员用充分混合的搅拌罐反应器与活塞流反应器的组合研究了 *Bacillus subtilis* AJ1992 发酵中混合的影响。在搅拌式发酵罐中进行分批发酵，pH 分别控制在 6.5 和 7.2 时，菌体生长差异不大，但代谢产物 3-羟基丁酮和 2, 3-丁二醇的最高总浓度则分别为 $3.25g \cdot L^{-1}$ 和 $1.0g \cdot L^{-1}$，乙酸浓度分别为 $0.28g \cdot L^{-1}$ 和 $0.56g \cdot L^{-1}$。因此，该菌株生产 3-羟基丁酮和 2, 3-丁二醇时对 pH 很敏感。进一步在搅拌罐和管式反应器组合发酵体系中研究混合不均匀条件下的发酵规律。发酵中 pH 控制在 6.5 ± 0.02，用 $5mol \cdot L^{-1}$ 的碱溶液调节 pH，直接加入搅拌罐反应器的发酵作为对照。另一组对照是控制 pH 的碱溶液也直接加入搅拌罐反应器，但发酵液以 120s 停留时间通过管式反应器。其他试验是在管式反应器中不同停留时间（30～240s）的组合反应器中进行的，但调节 pH 的碱是加到管式反应器中的。这些实验中菌体生长没有差异，说明活塞流反应器中 60s 或更长的停留时间造成的溶氧下降不是引起这种差异的原因，而 pH 差异则是主要原因。

大型发酵罐若能保持与实验发酵罐相同的混合时间，则可避免发酵过程放大时因混合的差异造成的影响，不过这是较难实现的方法，因为要维持放大后发酵罐与小型发酵罐相同的混合时间，单位体积反应器所需搅拌功率将大大高于模型罐，不但菌体受到的剪切作用会大大增大，而且由于搅拌热的增加，也提高了反应器的冷却负荷。例如，在控制同样的溶氧条件下，对于同一种搅拌形式，搅拌转速低时，青霉素的比生产率略高。不过研究人员采用 5.3L 发酵罐进行了重组米曲霉的连续培养，发现在恒定比生长速率和恒定溶氧时，搅拌转速在 $550 \sim 1000r \cdot min^{-1}$，搅拌功率在 $2.2 \sim 12.6kW \cdot m^{-3}$ 变化时，淀粉酶和糖化酶的生产没有变化，但是菌体形态有明显变化。发酵罐中最常用的搅拌桨是涡轮式搅拌桨，在大型发酵罐中通常将几个涡轮搅拌桨装在同一根轴上，如果搅拌桨采用发酵罐常用的 Rushton 叶轮，各个搅拌桨周围各形成一个混合区域，发酵液中相应存在几个区域，区域间的混合有一

定问题。采用涡轮搅拌桨与轴向流搅拌桨结合的组合桨有利于提高区域间混合的效果，从而提高搅拌的效率。另一选择是降低补入的培养基浓度。例如在基因工程菌的高密度发酵中，为了达到高菌体密度，流加的补料液浓度通常很高，以减少补料造成的稀释作用。但是，这也提高了对反应器混合性能的要求。为了减轻对大型发酵罐混合能力的要求，可以考虑适当降低补料液浓度。除此之外，还可考虑将补料液分成多股，在发酵罐的不同部位加入，甚至将补料液加到通入罐内的无菌空气流中，以提高补入的料液的分散效果。

7.7.2 放大过程的重要步骤

掌握对象的规律，对其作出数学描述，建立方程，然后通过方程的求解或数值计算进行工厂的设计计算，这是人们的普遍期望。由于生物反应过程的复杂性，这种以数学解析为基础的方法至今仍成效不大。在生物反应器放大的过程中所建立的数学模型都是以原型设备的流动模型为依据，而原型设备中的流动模型可用停留时间分布的实验数据来判定。然而放大了的生产规模反应器中真实的流动模型可能发生了变化，很可能在放大的反应器的不同部位出现不同的流动模型。另外，由于生物反应过程是一个复杂的生化过程，要使得到的数学模型能够对过程作出较好的描述，势必包含较多的参数。但为了能够对模型得出解析法的解，又不得不作某些重大的简化处理，即所谓的半数学模型法。完全的数学模型用于生物反应器的放大尚存在困难。

解决生物反应器放大问题的本质在于弄清反应器的几何尺寸、操作条件与环境因素的确切关系，以使实验室中的优化环境能在工业中重现。首先要从大量的实验材料中把握和找出影响生物反应过程的主要矛盾。然后以主要矛盾为基准建立完全的数学模型或半数学模型，并对所建立的数学模型进行求解。最后根据数学模型的求解结果进行生物反应器的放大。值得注意的是，在着重解决主要矛盾的同时，不可使次要矛盾激化成新的主要矛盾。例如，单纯按照体积溶氧传递系数相等为准则放大时，液体剪切率可能会上升到系统不可接受的程度，投入生产，就可使生产失败，必须注意不使这类情况出现，为此往往或多或少地要牺牲几何相似的原则。大小设备主要尺寸几何相似的原则使用因次分析法所建立的无因次数学关系式获得简化，因此这个原则并不是无关紧要的，但为了解决主要的矛盾，这种牺牲及其后果是次要的。

7.7.3 放大原则与经验放大方法

生物反应器放大的原则是相似性，放大方法的理论基础是相似原理。相似原理的基本点是：对任何反应系统可用数学方程描述其生物化学反应过程、流体流动与动量传递、热量和质量传递过程，如果两个系统能用相同的微分方程来描述，并具有相同的特征，则两个系统将具有同一的行为方式。理想的反应器放大应达到的相似条件是：①几何相似；②流体力学相似；③热相似；④质量（浓度）相似；⑤生物化学相似。其中，第①项和第②项最为重要，按此顺序，前一级是后一级的前提。第①项的含义是物理边界的相似性，即放大反应器与模型反应器的形状相似，两者所有部件的线性几何尺寸之比具有相同的数值。第②项则要求放大反应器中的物料流动速率与模型反应器相同，流体单元受到相同大小的各种作用力。并且，在几何相似的条件下两者的流动状态相似，此流动状态显示两者具有几何上相似的流型。

为应用相似原理达到相似条件，生物反应器的放大有多种方法，包括：①理论方法；

②半理论半经验法；③因次分析法；④缩小 - 放大法以及机制分析 - 时间常数分析法；⑤经验放大法等。目前反应器放大常用的方法是半理论半经验法和经验放大法。这些方法的特点均是保持部分对过程影响较大的参数不变，因此放大准则的选择将成为放大成功与否的关键。

评价生物反应器的传递过程特性主要从流体流动与混合、热量和质量传递各方面进行。由于热量传递仅发生在热量交换界面上，而流动与混合和质量传递既与生物过程的各宏观动力学因素有关，也涉及微观反应机制，因此反应器放大及其性能评价的关键准则主要与流体流动和质量传递性质有关。对任何微生物发酵或细胞培养过程，一般考虑多方面的性能，包括宏观混合、氧传递、流体剪切应力、CO_2 排出、泡沫形成和操作成本等，生物反应器的设计与操作受到各方面因素的限制。但是为满足各方面最优化条件，反应器设计时可以人为改变的只有几何结构、搅拌速度和通气速率。因此，一般在反应器放大时，需考虑下述与反应器结构变量和操作变量有关的性能参数，即放大准则：①反应器的几何特征；②氧的体积传递系数 K_La；③最大剪切应力（机械搅拌反应器可用搅拌叶端速度表示）；④单位液体体积的输入功率；⑤单位反应器有效体积的通气速率；⑥通气表观线速度；⑦混合时间；⑧搅拌雷诺准数；⑨动量因子。

在上述准则中，准则①是生物反应器放大时保持不变的基本条件，对其选择的理由是反应器几何尺寸对传递过程特性具有重要作用。用此准则也基于这样的事实：现有关于反应器放大的经验或经验关联式都是在几何相似的反应器中用实验方法建立的。在不同几何形状的反应器之间用这些关联式进行放大，需考虑关联式的有效性、实验验证的必要性或者根据特殊情况对关联式作出修正。由于生物反应器的功率消耗、流体剪切应力、搅拌器对液体的翻动量等传递过程的关键参数均是搅拌器结构、直径和搅拌速度的函数，因此搅拌器几何尺寸的改变必然引起较大的放大效应，反应器放大时不能对结构做较大改动。

在满足几何相似的条件下，常将准则② ~ ⑥用于生物反应器的放大。采用准则②的原因是，许多需氧发酵过程动力学速率常受氧传递限制，氧传递问题是发酵过程的主要问题，故反应器放大多采用恒定 K_La 准则。准则③对剪切敏感的细胞培养反应器放大至关重要。例如使用机械搅拌的生物反应器的放大，最关键的问题是防止流体剪切作用对细胞的损伤，以及丝状菌受剪切应力和搅拌桨叶端线速度的影响。准则④在机械搅拌发酵罐放大中较重要，原因是对一定的通气表观线速度，消耗的搅拌功率相等意味着氧传递系数相等，并且单位液体质量的功率消耗与湍流旋涡长度有关，保持此参数不变能够兼顾传质和流体剪切两方面的问题。准则⑤通气速率和⑥通气表观线速度是气体分散的重要指标，也是反应器流动状态和混合效果的重要参数，特别是对鼓泡反应器和气升式反应器，通气速率和表观线速度决定传质系数、液体循环和混合时间等关键参数。对准则⑦，由于混合时间与反应器中底物的浓度分布有关，故大型反应器与小型反应器必须保持混合时间相等。但是，维持相同的混合时间所需的单位体积输入功率输入的增加是系统总功率输入的 2/3，从而限制了放大规模。实验证明，按此准则放大所需的功率远大于等体积功率放大所需的功率。准则⑧和⑨没有考虑通气对过程结果的影响，一般不用于发酵过程。反应器放大时，既有保持上述准则之一不变的放大，也有同时保持满足若干相互关联准则的情况，表 7-9 是所列的几种关联的放大准则。

表 7-9　放大准则的关联

项目	关联 1	关联 2	关联 3
预定条件	几何相似（或 d/D 恒定）； K_La 恒定； 通气比 VVM 恒定	几何相似； K_La 恒定； 恒定剪切应力（或恒定搅拌桨叶端线速度）	K_La 恒定； 恒定搅拌桨叶端线速度； 通气比 VVM 恒定
待定条件	由 K_La 的关联式得出搅拌转速 n	通气速率 Vg 由 K_La 的关联式得出	d/D 数值在一定范围内变化

根据上述对反应器放大原则与准则的讨论，以下重点介绍实用性较强的经验放大法。

经验放大法是以相似原理为理论依据，特点是对生物反应过程的机制仅作简单的分析，依赖对已有装置的操作与设计经验进行反应器的放大。经验放大法的关键是对放大准则的选择。例如根据单位液体的搅拌功率消耗 P/V_L、k_La、搅拌转速 n、溶氧浓度、空气的表观线速度 u_s 和搅拌桨叶端线速度相等的原则进行放大，其中利用 P/V_L 和 k_La 恒定作为放大准则的较多。

在实际设计反应器时，放大准则的选择一般要根据生物反应的具体情况决定。采用不同的放大标准，对机械搅拌反应器放大所得到的结果会有很大差别。由于这种方法过于依赖经验，故只有在放大时细胞的代谢控制和传递过程控制的机制没有改变的情况下才有效。下面重点讨论搅拌生物反应器的经验放大法。

1. 通气速率放大　生物反应器通气速率的放大方法：①以单位液体体积在单位时间内的通气量（以标准状态计）VVM（$m^3 \cdot m^{-3} \cdot min^{-1}$）进行计算，常称为 VVM 相同法；②以通气表观线速度 u_s（$m \cdot h^{-1}$）进行计算。两者的换算关系为：

$$\frac{\pi}{4}D^2\mu_S = (VVM) \times 60 \times V_L \tag{7-36}$$

式中，V_L 表示液体体积（m^3）。

有关物理量的计算式为

$$\mu_S = \frac{60 \times (273+t) \times (9.81 \times 10^4)V_g}{273 \times \frac{\pi}{4}D^2 p_L} = \frac{27465.6V_g \times (273+t)}{p_L D^2}$$

$$= \frac{27465.6(VVM)(V_L) \times (273+t)}{p_L D^2} \ m \cdot h^{-1} \tag{7-37}$$

$$V_g = \frac{\mu_S p_L D^2}{27465.6 \times (273+t)} \ m^3 \cdot min^{-1} \tag{7-38}$$

$$VVM = \frac{\mu_S p_L D^2}{27465.6 \times (273+t)} \ m^3 \cdot m^{-3} \cdot min^{-1} \tag{7-39}$$

$$p_L = (p_T + 9.81 \times 10^4) + \frac{9.81}{2}H_L\rho_L \tag{7-40}$$

式中：t 为反应器温度（℃）；p_L 为液柱压力（Pa）；p_T 为反应器顶部气压（Pa）；H_L 为液体高度（m）；ρ_L 为液体密度（$kg \cdot m^{-3}$）。

以下计算时下标 1 代表模型反应器，下标 2 代表放大反应器。

1）以单位液体体积在单位时间内通气量相同的准则放大：根据等体积通气量恒定，有

$(VVM)_1=(VVM)_2$，根据式（7-37）和式（7-39）

$$\mu_S \propto \frac{(VVM)V_L}{p_L D^2} \propto \frac{(VVM)D}{p_L} \tag{7-41}$$

因此：
$$\frac{\mu_{S_2}}{\mu_{S_1}} = \frac{D_2}{D_1} \times \frac{p_{L_1}}{p_{L_2}} \tag{7-42}$$

式中：p_{L_1}、p_{L_2}为模型反应器、放大反应器的液柱压力（Pa）；u_{S_1}、u_{S_2}为模型反应器、放大反应器的通气表观线速度（$m \cdot h^{-1}$或 $m \cdot s^{-1}$）。

2）以通气表观线速度相同的准则放大：采用此法时，$u_{S_1}=u_{S_2}$，根据式（7-41）~式（7-42），有

$$\frac{(VVM)_2}{(VVM)_1} = \left(\frac{p_{L_2}}{p_{L_1}}\right)\left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2\left(\frac{V_{L_1}}{V_{L_2}}\right) = \frac{D_1}{D_2} \times \frac{p_{L_2}}{p_{L_1}} \tag{7-43}$$

3）以 k_La 值相同的准则放大：根据参考文献的报道并为其计算方便，对氧传递系数采用下式，$k_La \propto \left(\frac{V_g}{V_L}\right)H_L^{\frac{2}{3}}$，则

$$k_La \propto \frac{(k_La)_2}{(k_La)_1} = \frac{(V_g/V_L)_2}{(V_g/V_L)_1} \times \left(\frac{H_{L_2}}{H_{L_1}}\right)^{\frac{2}{3}} = 1 \tag{7-44}$$

于是
$$\frac{(V_g/V_L)_2}{(V_g/V_L)_1} = \left(\frac{H_{L_2}}{H_{L_1}}\right)^{\frac{2}{3}} \tag{7-45}$$

又因
$$V_g \propto \mu_S D^2,\quad V_L \propto D^3$$

故
$$\frac{\mu_{S_2}}{\mu_{S_1}} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\frac{1}{3}} \tag{7-46}$$

根据
$$\mu_S \propto \frac{(VVM)V_L}{p_L D^2} \propto \frac{(VVM)D}{p_L} \tag{7-47}$$

因此
$$\frac{(VVM)_2}{(VVM)_1} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{\frac{2}{3}}\left(\frac{p_{L_2}}{p_{L_1}}\right) \tag{7-48}$$

以上对通气速率的放大使用了 3 种不同的准则，得到不同的计算结果，若设 $V_{R_2}/V_{R_1}=125$，$D_2/D_1=5$，$p_{L_2}/p_{L_1}=1.5$，对计算结果进行对比，可得到如表 7-10 所示的结果。

表 7-10　3 种不同空气流量的放大结果对比

方法	VVM 值		u_s 值	
	放大前	放大后	放大前	放大后
VVM 相同	1	1	1	3.33
u_s 相同	1	0.3	1	1
k_La 相同	1	0.513	1	1.71

由表 7-10 中结果可见，若以 VVM 相同的准则放大，u_s 增加了 3.33 倍，此值过大，操作时会有搅拌器被空气流包围的状态，气体的分散效果较差。若以 u_s 相同的准则放大，放大后的 VVM 值仅为放大前的 30%，结果略小。因此，通气速率的放大一般以保持 k_La 相同为准则。

2. 搅拌功率及速率放大 可以选择不同的放大准则计算搅拌功率及搅拌速度，常用的方法有以下几种。

1）以恒定等体积功率的准则放大：这种方法以单位培养液体积所消耗的搅拌功率相等为基准进行放大，在保持几何尺寸相似的条件下，应有

$P \propto n^3 d^5$, $V_L \propto D^3 \propto d^3$

于是
$$\frac{P}{V_L} \propto n^3 d^2$$

所以
$$n_2 = n_1 \left(\frac{d_1}{d_2}\right)^{\frac{2}{3}} \tag{7-49}$$

$$P_2 = P_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^3 \tag{7-50}$$

式中：P、P_1、P_2 为搅拌功率、模型反应器搅拌功率、放大反应器的搅拌功率（W）；n、n_1、n_2 为搅拌速度、模型反应器搅拌速度、放大反应器的搅拌速度（r/s）；d、d_1、d_2 为搅拌器直径、模型反应器搅拌器直径、放大反应器的搅拌器直径（m）。

一般这种方法放大后的功率太高，因此也有以单位培养液体积所消耗的通气时的搅拌功率 P_g/V_L 相等的准则进行放大，此时

$$\left(\frac{P_g}{V_L}\right)_2 = \left(\frac{P_g}{V_L}\right)_1$$

为方便计算，一般使用 Michel 关联式计算通气时的搅拌功率，则

$$P_g = K\left(\frac{P^2 n d^3}{V_g^{0.56}}\right)^{0.45} \tag{7-51}$$

式中：P、P_g 为未通气、通气时的搅拌功率（W）。

在湍流条件下未通气的搅拌功率为

$$P = K n^3 d^5 \rho_L$$

所以
$$P_g \propto \left[\frac{(n^3 d^5)^2 n d^3}{(\mu_S d^2)^{0.56}}\right]^{0.45} \propto \frac{n^{3.15} d^{2.346}}{\mu_S{}^{0.252}}$$

$$\frac{P_g}{V_L} \propto \frac{n^{3.15} d^{2.346}}{\mu_S{}^{0.252}}$$

故
$$n_2 = n_1 \left(\frac{d_1}{d_2}\right)^{0.745} \left(\frac{\mu_{S_2}}{\mu_{S_1}}\right)^{0.08} \tag{7-52}$$

$$P_2 = P_1 \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^3 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^5 = P_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{2.765} \left(\frac{\mu_{S_2}}{\mu_{S_1}}\right)^{0.24} \tag{7-53}$$

2）以恒定体积溶氧传递系数 $k_L a$ 的准则放大：此法放大时首先应该计算模型反应器和放大反应器的表观通气线速度 u_s，根据前已得到的结果，有

$$\left(\frac{\mu_{S_2}}{\mu_{S_1}}\right) = \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{\frac{1}{3}} \tag{7-54}$$

代入式（7-53），并据保持几何相似的条件，$D \propto d$，可得

$$P_2 = P_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{2.83} \tag{7-55}$$

3）以恒定搅拌器叶端速度的准则放大：由于叶端速度相等，因此

$$n_2 d_2 = n_1 d_1 \tag{7-56}$$

$$n_2 = n_1 \left(\frac{d_1}{d_2}\right) \tag{7-57}$$

因
$$P \propto n^3 d^5$$

所以
$$P_2 = P_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2 \tag{7-58}$$

$$\left(\frac{P}{V_L}\right)_2 = \left(\frac{P}{V_L}\right)_1 \left(\frac{d_1}{d_2}\right) \tag{7-59}$$

应当注意，由这种方法所得搅拌功率数值较低。一般认为搅拌桨的叶端速度的合适范围为 2.5～5.0m·s^{-1}。

4）以混合时间 t_m 恒定为准则的放大：混合时间的定义是把少许具有与搅拌反应器内的液体相同物性的液体注入搅拌反应器内，两者达到分子水平的均匀混合所需要的时间。低黏度液体在小搅拌反应器内的混合时间很短。反应器愈大，混合时间就愈长。实际上按等混合时间放大是很难做到的，因为要做到这一点，放大后反应器的搅拌桨转速需要比小反应器搅拌桨转速提高很多。但作为一个校核的指标，对某些体系确实必要。对液体的混合时间 t_m，不同的研究者对不同类型的反应器型式和反应介质得到各种计算式，故设计时应当作出合理的选择。对机械搅拌反应器，一般混合时间 t_m 随反应器直径的增大而增大，但随搅拌速度的增加而减小，由研究得出

$$t_m \propto \frac{D^{\frac{1}{6}}}{n^{\frac{2}{3}}} \propto \frac{d^{\frac{1}{6}}}{n^{\frac{2}{3}}} \tag{7-60}$$

当 t_m 不变时，$t_{m_2} = t_{m_1}$，故

$$n_2 = n_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{\frac{1}{4}} \tag{7-61}$$

$$P_2 = P_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{5.75} \tag{7-62}$$

$$\left(\frac{P}{V_L}\right)_2 = \left(\frac{P}{V_L}\right)_1 \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^{2.75} \tag{7-63}$$

还有以恒定雷诺准数作为放大的准则等。

值得注意的是，由以上的计算可见，各种计算方法因使用的放大准则不同，其计算结果是不一样的。表 7-11 表示了由 10L 模型反应器（$n = 500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$，通气量 1VVM）放大到 10000L 时，按照不同的准则所得出的结果。可见，放大后搅拌速度的较大差别意味着反应器的操作条件的不同，因此反应器的放大准则的选择必须合理，要根据特定反应体系和设计条件，选择使用适当的准则。

表 7-11　采用不同准则放大后的搅拌转速

方法	放大后搅拌转速（r·min^{-1}）	方法	放大后搅拌转速（r·min^{-1}）
非通气	107	等传质系数	79
通气	85	等叶端速度	50
等混合时间	1260		

以恒定等体积功率的准则放大是目前常用的方法之一，这种方法与实际情况基本符合。这种方法的主要缺点是得到的以搅拌桨叶端速度表示的最大剪切应力较大。也有报道指出，以恒定传质系数 k_La 为准则比较合理，因为体积传质系数与单位体积的功率消耗关联，但是要考虑通气的表观线速度的影响。在应用恒定传质系数放大时，应该考虑大型反应器由于气泡在反应器内停留时间较长而发生凝并的问题，此时体积溶氧传递系数的关联式应采用有关气泡凝并的关联式。

在放大时还要明确典型的搅拌器直径与反应器直径之比为 0.33 ~ 0.44，使用大直径的桨叶比较有利，它的混合能力较强，对细胞的损伤较小。大型反应器与小型反应器的主要差别是，前者具有较长的混合时间、较高的最大剪切应力和较低的时均剪切率。在反应器放大时，对反应介质的流变特性也应予以重视。对多数微生物反应过程，特别是抗生素一类的发酵过程，培养介质多为非牛顿型流体，因此，如果使用常规的放大计算方法，功率消耗和传质系数关联式必须选用非牛顿型流体的有关计算式。

本章小结

生物反应器是生物反应过程的核心设备，要求它能为进行各种生物反应过程提供良好的反应环境和条件。本章介绍了几种在生物反应过程中常用的生物反应器的结构特点、操作特性及其应用，这些反应器包括机械搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、膜式生物反应器和管式生物反应器。在此基础上介绍了几种常用的生物传感器和生物反应过程的控制方法与技术。鉴于生物反应器放大是生物反应过程开发的重要组成部分，本章最后介绍了生物反应器放大对细胞代谢的影响、生物反应器放大的原则、步骤及目前应用最广泛的放大方法——经验放大法。

参考文献

白玲，蓝伟光，严滨，等. 2008. 废水处理中膜生物反应器的研究进展. 膜科学与技术，28：91 ~ 96
方章平，杨平，郭勇，等. 2004. 膜生物反应器处理废气. 现代化工，24：218 ~ 221
梅乐和. 1999. 生化生产工艺学. 北京：科学出版社
戚以政. 1999. 生化反应动力学与反应器. 北京：化学工业出版社
戚以政. 2004. 生物反应工程. 北京：化学工业出版社
温少红. 2001. 细胞反应过程模型及计算机模拟. 济南：济南出版社
王树青. 1998. 生化工程自动化技术. 北京：化学工业出版社
王岁楼. 2002. 生化工程. 北京：中国医药科技出版社
叶勤. 2005. 发酵过程原理. 北京：化学工业出版社
俞俊堂. 1992. 生物工艺学. 上海：华东化工学院出版社
张元兴. 2001. 生物反应器工程. 上海：华东理工大学出版社
赵英，顾平，白晓琴. 2008. 运行工艺对膜生物反应器的影响. 化工学报，1：209 ~ 213
Garcia-Ochoa Felix，Gomez Emilio. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer in microbial processes：An overview. Biotechnol Adv，27：153 ~ 176
Gill N K，Appleton M，Baganz F，et al. 2008. Design and characterization of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. Biochem Eng J，39：164 ~ 176

Gogate P R, Kabadi A M. 2009. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. Biochem Eng J, 44: 69 ~ 72

Jérôme Harmand, Alain Rapaport, Denis Dochain, et al. 2008. Microbial ecology and bioprocess control: opportunities and challenges. J Process Control, 18: 865 ~ 875

Pradip B Dhamole, Rashmi R Nair, Stanislaus F DSouza, et al. 2009. Simultaneous removal of carbon and nitrate in an airlift bioreactor. Bioresour Technol, 100: 1082 ~ 1086

习　题

1. 生物反应器有哪几种分类方法?
2. 简述几种常见生物反应器的结构特点、操作特性及其应用范围。
3. 在选择生物反应器进行生物反应时，要考虑哪些因素?
4. 机械搅拌式生物反应器是由哪些主要部件组成的?
5. 挡板的作用是什么? 什么是“全挡板条件”?
6. 搅拌器有哪几种类型? 在生物反应器中选用搅拌器时要考虑哪些因素?
7. 发酵过程中可以检测的物理参数、化学参数及生物参数有哪些?
8. 常用于生物反应器检测的生物传感器有哪些?
9. 生物反应过程控制的主要内容有哪些? 简述主要参数的控制方法与技术。
10. 生物反应器放大的原则是什么? 经验放大方法包括哪些?
11. 对一带有挡板的通用式机械搅拌槽反应器，已知 $D = 2\text{m}$，$H_L = 2\text{m}$，$N = 2\text{s}^{-1}$，搅拌器为螺旋桨，其 $d = 0.66\text{m}$，通气比 0.5min^{-1}，反应液的密度为 $1000\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$，黏度为 $0.001\text{Pa} \cdot \text{s}$。试求该反应器的搅拌功率。
12. 有一 5m^3 生物反应器，其直径为 1.4m，装液量 4m^3，液柱高 2.7m，采用六弯叶涡轮搅拌器，叶径为 0.45m，搅拌转数 $N = 190\text{min}^{-1}$，通气比为 1:0.2，反应液密度为 $\rho_L = 1000\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$，反应液黏度 $\mu_L = 1.06 \times 10^{-3}\text{Pa} \cdot \text{s}$，现需放大至 50m^3 进行生产，若按单位体积消耗功率与 k_La 值均相同的准则进行放大，试求放大后反应器的主要尺寸（D、H、d）和工艺条件（Q_g、P、N）。
13. 中试发酵罐装料 800L，罐直径为 0.8m，$H_L/D = 2$，装料系数为 0.68，搅拌器直径为 0.27m，转速为 300min^{-1}，通气量为 1.2VVM，发酵温度为 28℃，罐压为 0.0294MPa，发酵液密度为 $\rho_L = 1000\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$，不通气时功率为 $3\text{kW} \cdot \text{m}^{-3}$，通气时为 $1.6\text{kW} \cdot \text{m}^{-3}$，若要求分别用恒定 k_La 法对空气流量放大，用恒定 P_g/V_L 法对搅拌速度和功率放大，计算反应器放大 150 倍的生产罐主要尺寸和操作条件。

第 8 章　发酵过程设计

【重要概念】

生物过程设计、分批反应过程、连续反应过程、流加反应过程、高细胞密度发酵、SBR生物反应过程、UASB 生物反应过程

引言

生物反应过程的设计，是在掌握生物反应动力学特征、反应器内流体传递特性的基础上，对生物反应器的型号、操作方式进行合理选择，并进行有关设计和优化。生物反应器的运行是生物技术工艺的中心环节，对生物反应器的选择与设计是生物工程尤其是生物反应工程的中心问题。在进行反应器设计时，首先要根据反应的本征动力学特性、生产工艺要求及物料特性，对反应器进行选型，确定操作方式，然后进行设计计算。不同的反应器的类型和不同的操作方式，可对反应动力学和反应器的生产效率产生明显不同的影响。

8.1　生物过程设计基础与选择原则

根据反应器加料和出料方式的不同，可将生物反应过程分为分批反应过程、连续反应过程和流加反应过程。

（1）分批反应过程：其主要特点是反应物料一次性加入和一次性排出，在反应过程中，反应器内外一般没有物料的交换；反应器内物料体积维持恒定，并具有相同的反应时间；反应器内的化学和物理状态将随时间而变化，细胞生长不能始终在最优的条件下进行，反应过程处于非定态操作；分批式操作适合于多品种、小批量的生产过程和反应速率较慢的细胞反应，它不易发生杂菌污染和菌种变异，因此，它是生物反应中应用最早又最多的一种操作方式。

（2）连续反应过程：其主要特点是在反应进行过程中，反应底物连续稳定地输入反应器，同时反应产物亦以相同的流速连续稳定地流出反应器，因此，反应器内物料体积恒定，反应器内任一位置反应物系的浓度将不随反应时间而变化。其优点是反应条件恒定、产品质量稳定、生产效率较高，常用于固定化酶催化反应。对细胞反应，存在染菌和菌种退化问题。若实施长期操作并维持细胞活性则存在困难，使其应用受到一定限制。它仅适用于遗传性稳定、反应条件不易受环境污染的细胞反应过程，如乙醇或丙酮/丁醇发酵和污水的生物处理过程等。

（3）流加反应过程：也称半连续发酵，它的主要特点是在反应进行过程中，反应物或

连续或分批式地加入，而产物则一次性或间断性地排出。因此，它兼具了分批反应过程和连续反应过程的有关特性，在一定程度上弥补了它们的不足。该类操作方式主要用于细胞反应过程。按流加反应过程的分批特性和补料方式进行区分，此类操作包含下述 3 种操作模式。

① 流加操作：该操作是先将少量培养液加入反应器中，并以分批培养的模式进行细胞的培养和生长，当细胞浓度达到一定数值后，向反应器内加入某种特定的一种或多种限制性底物，即流加过程开始。在其反应过程中，由于加料，致使反应器中的物料体积不断增大。当反应过程结束时将培养液一次性从反应器中排出。流加操作的主要特点是能够调节细胞反应环境中营养物质的浓度。它还能防止某些限制性营养成分由于在反应过程中被耗尽而影响细胞的生长和产物的形成。因此，它能延长细胞生长稳定期的时间，适合于次级代谢产物合成的特点以提高其产量，也有利于实现细胞的高密度培养。此外，由于限制性底物的加入，反应过程中反应器的有效体积，即物料体积是变化的，这也是流加操作的一个重要特征。

根据不同的反应特点，可采用不同的流加方式。从控制角度可分为无反馈控制流加和有反馈控制流加两种，前者包括指数流加和恒速流加等，后者则是根据测定的限制性底物浓度来调节流加速率或流加液中限制性底物的浓度等。

② 反复流加操作：它是在流加操作过程中，定时排出一定体积的反应液，其余部分留作下一阶段流加操作时细胞培养的种子，以期不断进行流加操作过程，因此，该操作又称为循环式流加操作。它不仅具有前述流加操作的特点，又具有不需要单独进行菌种培养的优点。

③ 反复分批操作：它是在分批反应过程中，当细胞浓度由于生长反应达到某规定值后，将反应液排出其中的一部分，剩余部分留作下批培养的种子，然后再加入新培养基进行分批培养。与反复流加操作的主要不同是，其培养基为一次性加入，在反应进行的过程中，则无底物的加入，反应器内培养液的体积保持不变。

生物过程的选择原则是根据所要进行的生物反应（酶催化反应和细胞反应）过程特性选择与其相匹配的生物反应过程。如多品种、小批量的生物反应过程和反应速率较慢的细胞反应，一般选择分批反应过程进行操作；对于高细胞密度培养和存在底物抑制与使用缺陷型变异株的细胞反应过程，一般选择流加反应过程；而对产品的质量及其稳定性有很高的要求时，可以考虑采用连续生物反应过程。表 8-1 列出了不同操作模式的优、缺点，可根据不同操作模式的特点进行权衡比较，选择比较适合进行的生物反应的操作模式或过程。

表 8-1　不同操作模式的优、缺点

模式	优　　点	缺　　点
分批反应过程	（1）一般投资较小； （2）易转产，生产灵活； （3）分批反应过程中某一阶段可获得高的转化率； （4）发酵周期短，菌种退化率小。	（1）因放罐、灭菌等原因，非生产时间长； （2）经常灭菌会降低仪器寿命； （3）前培养和种子的花费大； （4）需较多的操作人员或较多的自动控制系统。
连续反应过程	（1）可实现有规律的自动化； （2）操作人员少； （3）反应器体积小、非生产时间少； （4）产品质量稳定； （5）操作人员接触毒害物质可能性小； （6）测量仪器使用寿命长。	（1）操作不灵活； （2）因操作条件不易改变，原料质量必须稳定； （3）若采用连续灭菌，加上控制系统和自动化设备，投资较大； （4）必须不断地排除一些非溶性的固形物； （5）易染菌，菌种易退化。

续表

模式	优　　点	缺　　点
流加反应过程	（1）操作灵活； （2）染菌、菌种退化的概率小； （3）可获得高的转化率； （4）对发酵过程可实现优化控制。	（1）非生产时间长； （2）需较多的操作人员或计算机控制系统； （3）操作人员接触一些病原菌和有毒产品的可能性大； （4）因常灭菌会缩短仪器使用寿命。

8.2　分批反应过程

分批反应过程主要特点是物料一次性加入和放出，反应过程中反应器内、外没有物料的交换，故它是在封闭系统进行的过程；反应器中底物浓度、产物浓度以及细胞浓度均随反应进行的时间而变化，如图 8-1 所示。

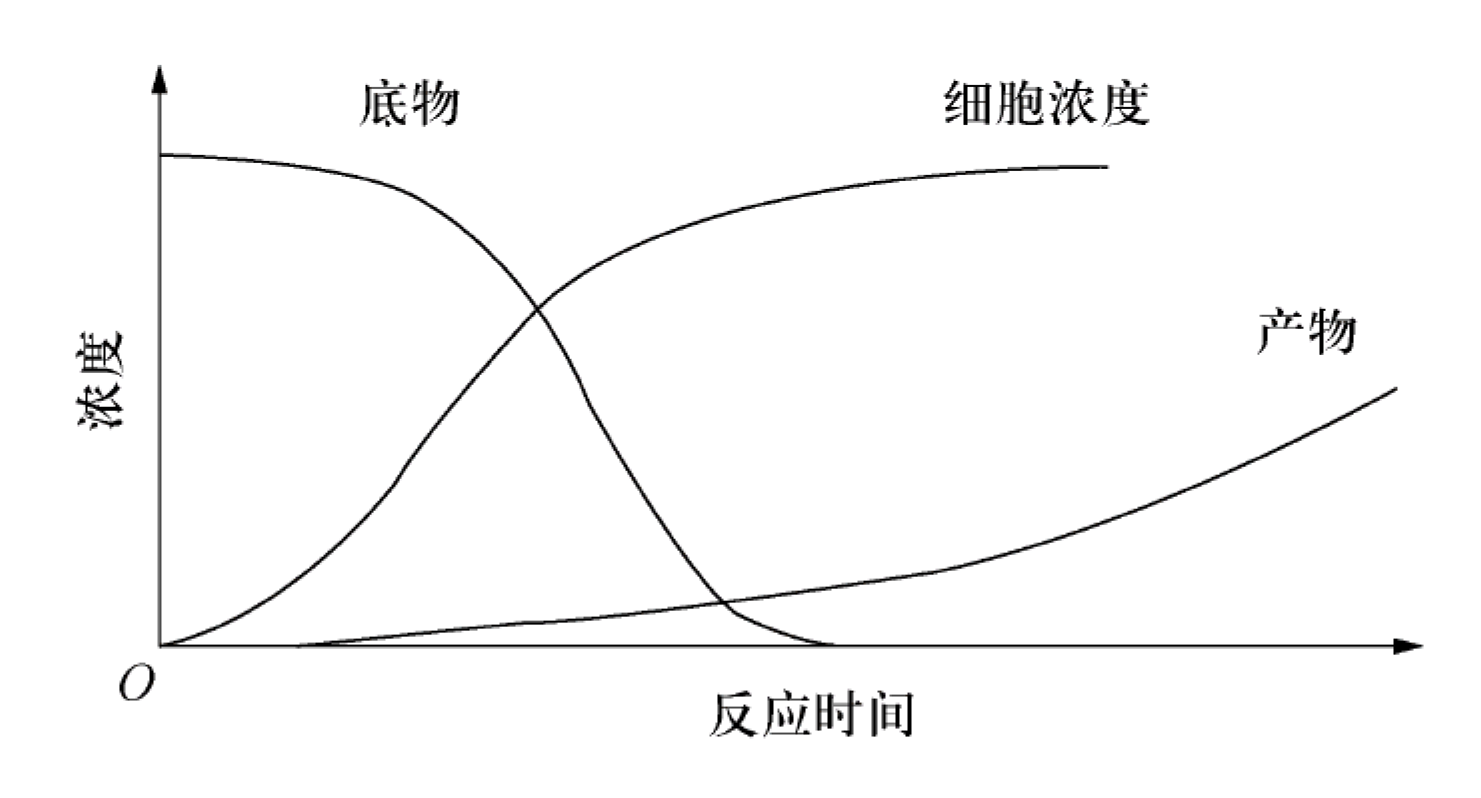


图 8-1　分批反应过程中的浓度变化过程

故分批反应过程是一非稳态过程。由于反应器内物料同时加入并同时停止反应，所有物料具有相同的停留时间和反应时间。当以反应速率为最大目标时，由于操作过程中反应物和产物浓度随时间发生变化，并且有些过程的产物对反应有抑制作用，因此随反应过程的进行，分批操作反应器的效率将降低。

分批反应过程在生物过程中占有重要地位，主要原因是它具有以下优点：

（1）较适合多品种、小批量的生产过程。有不少生物制品是小批量生产的，因此使用同一台反应装置，可进行多品种的生产。

（2）较适合反应速率较慢的生物反应。由于多数生物反应的速率较化学反应慢，故较多工业过程使用具有分批操作特征的大容量生物反应器。

（3）分批进行的生物反应过程染菌率较小。

分批反应过程的缺点是，生产量小，发酵过程为非稳态，不易控制；反应过程中当有害物质积累或基质以及产物抑制时，对细胞生长不利，生产率较低；细胞或酶的反应环境随时间改变，产物生成速率与反应时间有关；下游产物分离必须分批进行等。

本节的主要内容包括分批反应过程动力学和分批反应过程优化。

8.2.1　分批反应过程曲线

由于多数分批反应过程在机械搅拌反应器中进行，因此一般假定分批搅拌反应器中搅拌

的作用可以使反应器内物料的浓度达到分子尺度的均匀，且反应器内浓度和温度分布均匀，这种分批搅拌反应器可称为理想分批反应器。分批反应器的操作时间包括进行反应所需要的时间和进料、灭菌、卸料、清洗等所需的辅助时间，常分别以 t_r 和 t_b 表示。分批反应器设计的重点是确定反应时间，它由过程的反应速率确定，而辅助操作时间则由生产经验确定。分批反应器的有效体积由总操作时间与单位时间内反应物的处理量共同确定。

对于用分批搅拌槽式反应器做物料衡算时，应掌握其两个主要特性：一是在反应进行过程中无物料的输入和输出；二是由于搅拌的作用，反应器内物料充分混合，浓度均一，而且反应物系的浓度仅随反应时间而变化。因此可以对整个反应器做物料衡算：

反应组分的转化速率 = 反应组分的累积速率

即：
$$V_R r_S = -\frac{dn_S}{dt} \tag{8-1}$$

式中：V_R 为反应器有效体积（L）；n_S 为组分 S 的量（g）；r_S 为底物 S 的消耗速率（$g \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$）。

$$r_S = -\frac{1}{V_R} \times \frac{dn_S}{dt} = -\frac{1}{V_R} \times \frac{d(V_R c_S)}{dt} \tag{8-2}$$

式中：c_S 为组分 S 的浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

对液相反应，如反应器有效体积不随时间发生变化，则有：

$$r_S = -\frac{dc_S}{dt} \tag{8-3}$$

若反应开始组分 S 的浓度以 c_{S_0} 表示，分离变量并积分可得：

$$t_r = -\int_{c_{S_0}}^{c_S} \frac{dc_S}{r_S} \tag{8-4}$$

式中：t_r 为反应时间（s）；c_{S_0}为底物 S 的初始浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

若设反应组分的转化率为 X_S，即：

$$X_S = \frac{c_{S_0} - c_S}{c_{S_0}} \tag{8-5}$$

则式（8-4）可变为：
$$t_r = c_{S_0}\int_0^{X_S} \frac{dX_S}{r_S} \tag{8-6}$$

式中：X_S 为底物 S 的转化率。

式（8-4）和式（8-6）为分批搅拌反应器的基本方程，表示反应组分转化至一定程度所需的反应时间，它取决于反应速率的大小，反应速率越大，反应时间越少。以下分别计算酶反应和细胞反应过程的反应时间。

1）均相酶反应过程：如酶反应为单底物无抑制反应，且动力学关系符合 M – M 方程，由式（8-6）可得：

$$t_r = c_{S_0}\int_0^{X_S} \frac{dX_S}{r_{max}\dfrac{c_S}{K_m + c_S}} = \frac{c_{S_0}}{r_{max}}\int_0^{X_S}\left(1 + \frac{K_m}{c_S}\right)dX_S \tag{8-7}$$

积分可得：
$$r_{max} t_r = c_{S_0} X_S + K_m \ln\frac{1}{1 - X_S} \tag{8-8}$$

或：
$$r_{max} t_r = (c_{S_0} - c_S) + K_m \ln\frac{c_{S_0}}{c_S} \tag{8-9}$$

可见，当要求的底物转化率一定时，反应时间 t_r 取决于初始底物浓度，也取决于与反应条件有关的米氏常数的大小。它们与反应时间 t_r 的关系有如下两种简化情况。

当 $c_{S_0} \ll K_m$ 时，即反应呈一级反应特征时：

$$r_{max} t_r = K_m \ln \frac{1}{1 - X_S} = K_m \ln \frac{c_{S_0}}{c_S} \tag{8-10}$$

当 $c_{S_0} \gg K_m$ 时，即反应呈零级反应特征时：

$$r_{max} t_r = c_{S_0} X_S = c_{S_0} - c_S \tag{8-11}$$

如初始底物浓度以无量纲浓度 c_{S_0}/K_m 表示，则反应时间与初始底物浓度的关系如图 8-2 所示。从图中可以看出，当 c_{S_0}/K_m 值较小时，近似为一级反应，在 X_S 一定时，t_r 将不随 c_{S_0}/K_m 值而变化；当 c_{S_0}/K_m 值较大时，近似为零级反应，此时 t_r 将随 c_{S_0}/K_m 值成正比例增加。

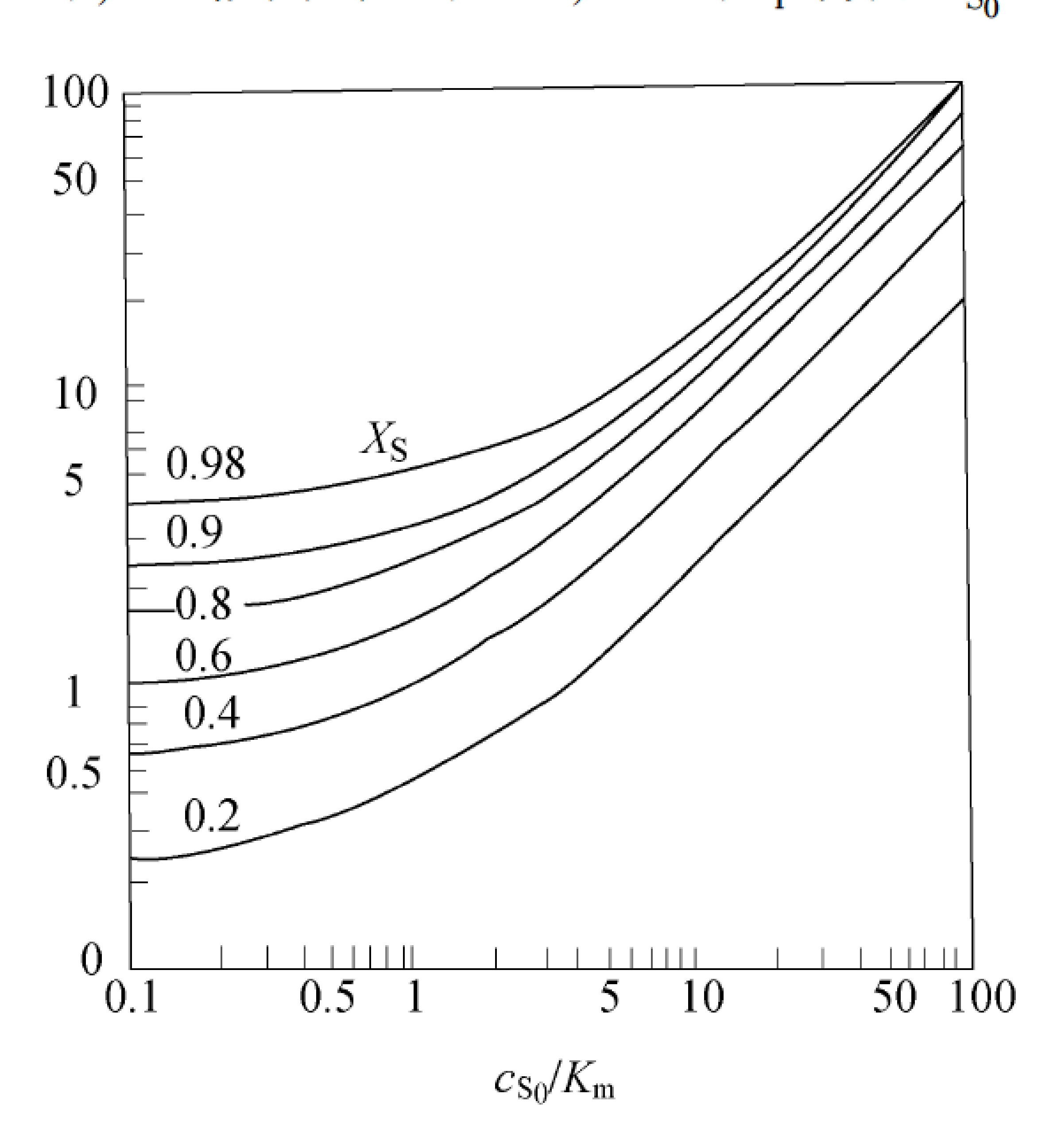


图 8-2　不同转化率下分批反应时间与 c_{S_0}/K_m 的关系

对于存在酶失活的反应，如果符合一级失活模型，则有：

$$r_{max} = k_2 c_E = k_2 c_{E_0} \exp(-k_d t_r) \tag{8-12}$$

将其代入式（8-6），积分可得到在不同失活速率下，为达到一定转化率所需要的反应时间的关系式，即：

$$t_r = -\frac{1}{k_d} \ln \left[1 - \frac{k_d}{k_2 c_{E_0}} \left(c_{S_0} X_S + K_m \ln \frac{1}{1 - X_S} \right) \right] \tag{8-13}$$

式中：k_d 为酶失活常数；c_{E_0} 为初始酶浓度（$mol \cdot L^{-1}$）；k_2 为酶反应速率常数。

2）固定化酶反应过程：假定反应过程发生在固定化酶颗粒内，反应速率不受外扩散限制，但受内扩散限制。设反应器中的空隙率（液相体积/反应器有效体积）为 ε_L，则固定化酶颗粒所占的体积分数为（$1 - \varepsilon_L$），在单位时间内，反应器中底物的消耗量为（$1 - \varepsilon_L$）$V_R \eta r_S$，累积项则为反应器内液相中底物随时间的变化率，它为 $\varepsilon_L V_R \frac{dc_S}{dt}$，物料衡算式为

$$(1 - \varepsilon_L) V_R \eta r_S = -\varepsilon_L V_R \frac{dc_S}{dt} \tag{8-14}$$

对其积分可得：

$$t_r = \frac{-\varepsilon_L}{1-\varepsilon_L}\int_{c_{S_0}}^{c_S}\frac{dc_S}{\eta r_S} = \frac{c_{S_0}\varepsilon_L}{1-\varepsilon_L}\int_0^{X_S}\frac{dX_S}{\eta r_S} \tag{8-15}$$

或表示为：

$$t_r = c_{S_0}\frac{V_L}{V_P}\int_0^{X_S}\frac{dX_S}{\eta r_S} \tag{8-16}$$

式中：V_P 为固相催化剂体积（L）；V_L 为液相体积（L）；r_S 为以催化剂体积为基准的反应速率（$g \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$）；$\eta$ 为内扩散有效因子。

如反应速率以单位催化剂的质量来定义，并表示为 r_{SW}，则有：

$$t_r = c_{S_0}\frac{V_L}{W}\int_0^{X_S}\frac{dX_S}{\eta r_{SW}} \tag{8-17}$$

式中：W 为催化剂的质量（g）。

若进行式（8-15）和式（8-17）的积分，则必须先求出 $\eta - X_S$ 关系。

通常当酶反应为一级反应，即 $c_{S_0} \ll K_m$ 时，内扩散有效因子 η 与转化率 X_S 的大小无关，η 为一常数，此时有：

$$r_{max}t_r\eta\frac{1-\varepsilon_L}{\varepsilon_L} = K_m\ln\frac{c_{S_0}}{c_S} = K_m\frac{1}{1-X_S} \tag{8-18}$$

当固定化酶的颗粒很小，内扩散的影响可以忽略时，有效因子 $\eta=1$，则反应时间可由下式计算，即：

$$r_{max}t_r\eta\frac{1-\varepsilon_L}{\varepsilon_L} = c_{S_0}X_S + K_m\ln\frac{1}{1-X_S} \tag{8-19}$$

3）细胞反应过程：由于分批反应器内细胞的生长经历迟滞期、指数生长期、减速期和衰亡期 4 个阶段，并且难以用统一的动力学方程来表示细胞生长的全过程，因此总反应时间的确定比较困难。其中只有指数生长期和减速期可以采用下述方法来确定其相应的反应时间 t_r，而迟滞期和静止期所需时间只能根据实验来确定。

（1）若以达到一定细胞浓度来确定所需反应时间，假设细胞生长仅有一种限制性底物，且符合 Monod 方程，做该反应器细胞质量衡算，则得到下式：

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu c_X = \frac{\mu_{max}c_S}{K_S + c_S}c_X \tag{8-20}$$

式中：μ 为比生长速率（h^{-1}）。

当所有底物均消耗于细胞生长，得率系数 $Y_{X/S}$ 为一常数，则：

$$c_X = c_{X_0} + Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S) \tag{8-21}$$

式中：c_{S_0}、c_{X_0} 为指数期开始的底物浓度、细胞浓度（$g \cdot L^{-1}$）；c_S、c_X 为指数期结束时的底物浓度、细胞浓度（$g \cdot L^{-1}$）；$Y_{X/S}$ 为细胞对底物的得率系数。

将式（8-21）代入可得：

$$\mu = \mu_{max}\frac{c_{S_0} - \frac{1}{Y_{X/S}}(c_X - c_{X_0})}{K_S + c_{S_0} - \frac{1}{Y_{X/S}}(c_X - c_{X_0})}$$

或：

$$\mu = \mu_{max}\frac{Y_{X/S}c_{S_0} - c_X + c_{X_0}}{Y_{X/S}K_S + Y_{X/S}c_{S_0} - c_X + c_{X_0}} \tag{8-22}$$

将式（8-22）代入式（8-20），并积分可得

$$\mu_{\max} t_r = \int_{c_{X_0}}^{c_X} \frac{Y_{X/S}K_S + Y_{X/S}c_{S_0} - c_X + c_{X_0}}{Y_{X/S}c_{S_0} - c_X + c_{X_0}} \times \frac{1}{c_X} dc_X \tag{8-23}$$

分部积分可得反应时间的计算式：

$$\mu_{\max} t_r = A\ln\frac{c_X}{c_{X_0}} - B\ln\frac{c_S}{c_{S_0}} \tag{8-24}$$

其中：

$$A = \frac{Y_{X/S}K_S + Y_{X/S}c_{S_0} + c_{X_0}}{Y_{X/S}c_{S_0} + c_{X_0}} \tag{8-25}$$

$$B = \frac{Y_{X/S}K_S}{Y_{X/S}c_{S_0} + c_{X_0}} \tag{8-26}$$

当 c_X 已知，则 c_S 确定，可根据式（8-24）求出反应时间 t_r。

若以 $\frac{1}{r_X} - c_X$ 对应作图，如图 8-3 所示，图中曲线采用 Monod 方程求出，曲线下所包围面积为 t_r。

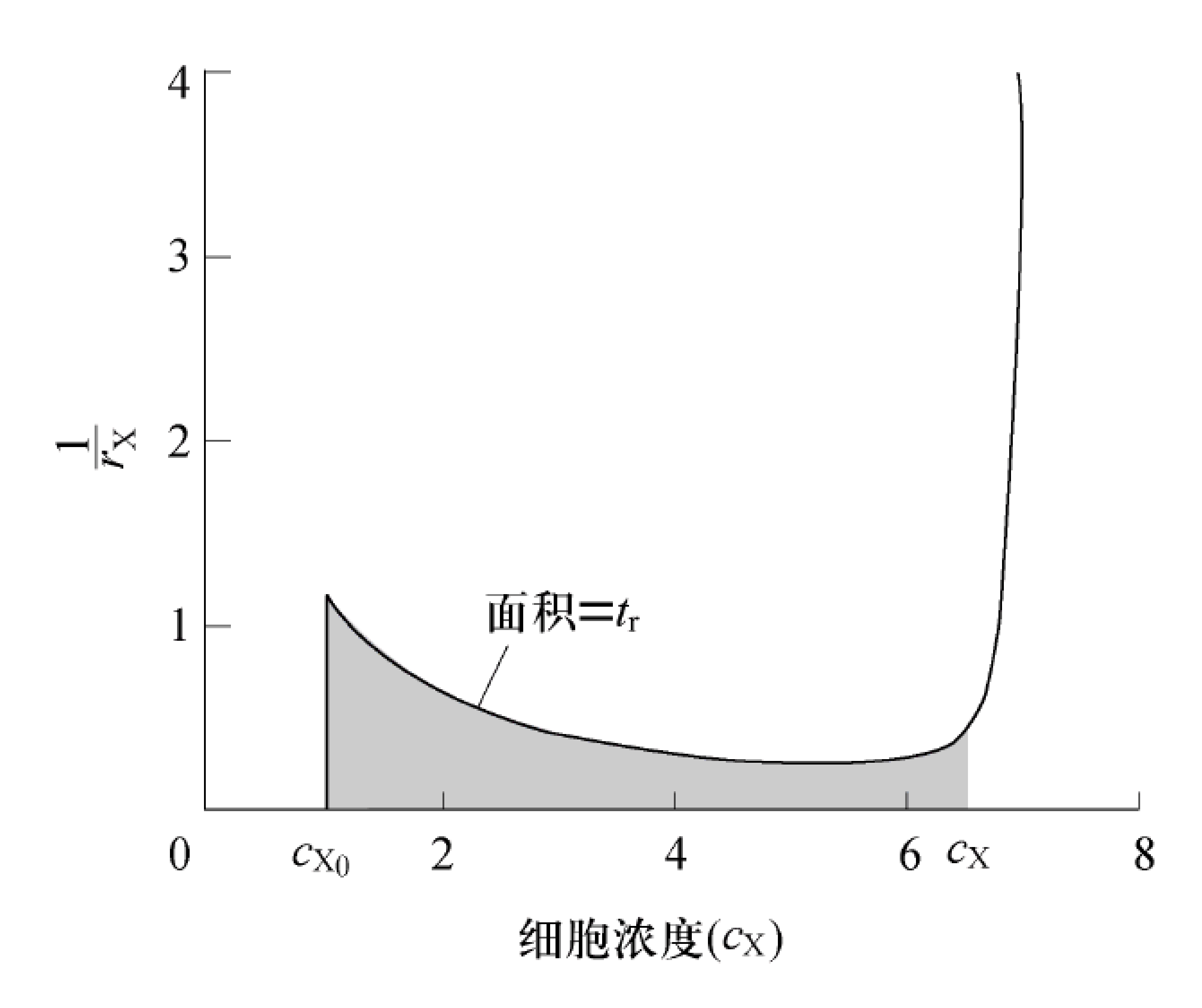


图 8-3　作图法求细胞分批培养时间 t_r

当 $c_S \gg K_S$ 时，$\mu = \mu_{\max}$，式（8-20）积分得：

$$\mu_{\max} t_r = \ln\frac{c_X}{c_{X_0}} \tag{8-27}$$

或

$$c_X = c_{X_0}\exp(\mu_{\max} t_r) \tag{8-28}$$

为一指数生长曲线。

如果考虑存在细胞死亡，则有：

$$c_X = c_{X_0}\exp[(\mu_{\max} - k_d)t_r] \tag{8-29}$$

当 $c_S \ll K_S$ 时，$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_S}c_S$，则有：

$$\mu_{\max} t_r = \frac{K_S}{c_{S_0} + \frac{1}{Y_{X/S}c_{X_0}}}\ln\frac{c_{S_0}c_X}{c_S c_{X_0}} \tag{8-30}$$

为一 S 型生长曲线。

（2）若以底物的消耗程度确定 t_r，则根据其质量平衡式，假设底物消耗于细胞生长、维持能和产物生成，且 $c_S \gg K_S$，则 $\mu = \mu_{\max}$，并有：

$$\frac{-\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t} = \left(\frac{\mu_{max}}{Y_G} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right)c_X \tag{8-31}$$

式中：Y_G为理论细胞得率；$Y_{P/S}$为理论产物得率。

若忽略细胞死亡，即 $k_d=0$，则上式可表示为：

$$\frac{-\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t} = \left(\frac{\mu_{max}}{Y_G} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right)c_{X_0}\exp(\mu_{max}t) \tag{8-32}$$

当括号内为常数，积分可得：

$$\mu_{max}t_r = \ln\left[1 + \frac{c_{S_0} - c_S}{\left(\frac{1}{Y_G} + \frac{q_P}{\mu_{max}Y_{P/S}} + \frac{m_S}{\mu_{max}}\right)c_{X_0}}\right] \tag{8-33}$$

该式为 $t_r - c_S$ 关系式。

（3）若以产物的生成程度确定 t_r，同样根据其质量平衡式，且 $c_S \gg K_S$，$\mu = \mu_{max}$，则有：

$$\frac{\mathrm{d}c_P}{\mathrm{d}t} = q_P c_X = q_P c_{X_0}\exp(\mu_{max}t) \tag{8-34}$$

式中：c_P 为产物浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

当 q_P为常数，积分可得：

$$\mu_{max}t_r = \ln\left[1 + \frac{\mu_{max}}{c_{X_0}q_P}(c_P - c_{P_0})\right] \tag{8-35}$$

该式为 $t_r - c_P$ 关系式。

若细胞生长存在产物抑制时，即存在关系式（8-36）和式（8-37）：

$$\mu = \mu_{max}(1 - k_P c_P) \tag{8-36}$$

$$\mu_{max}^* = \mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{P_{max}}}\right)^n \tag{8-37}$$

此时：

$$r_X = \mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{Pmax}}\right)^n \frac{c_S}{K_S + c_S}c_X \tag{8-38}$$

上述各式中 k_P 为产物抑制速率常数，$c_{P_{max}}$ 为细胞停止生长时的产物浓度，n 为产物的抑制指数，μ_{max}^* 为表观最大比生长速率。

假设 $c_S \gg K_S$，$n=1$，则：

$$r_X = \mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{P_{max}}}\right)c_X \tag{8-39}$$

且有：

$$c_P - c_{P_0} = Y_{P/X}(c_X - c_{X_0})$$

则：

$$c_X = c_{X_0} + \frac{1}{Y_{P/X}}(c_P - c_{P_0}) \tag{8-40}$$

$$r_P = Y_{P/X}r_X = \mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{P_{max}}}\right)(c_P - c_{P_0} + Y_{P/X}c_{X_0}) \tag{8-41}$$

同样积分可得：

$$\mu_{max}t_r = \frac{c_{P_{max}}}{c_P - c_{P_0} + Y_{P/X}c_{X_0}}\ln\frac{c_X(c_{P_{max}} - c_{P_0})}{c_{X_0}(c_{P_{max}} - c_P)} \tag{8-42}$$

该式表示了有产物抑制时的 $t_r - c_X$ 的关系式。

细胞生长反应动力学复杂时，亦可用数值积分来求解，以求得 c_X、c_S 和 c_P 随时间的变化曲线。

8.2.2 分批反应过程优化

无论是酶催化反应，还是细胞反应，总是希望以最小的费用来获得最大的利益。作为优化目标的函数，可以取产量、生产率和利润，也可以对这些指标进行多目标函数优化。最优化的变量有反应结束的时间即反应时间 t_r、培养基组成、温度、pH 等。

对简单的酶催化反应，在进行分批操作反应时，其考虑的变量是反应时间 t_r 值，因在分批操作中，每一操作周期都包括反应时间和辅助时间。对一定反应和反应器，其辅助时间是一定值。在反应过程中，反应底物浓度是逐渐下降的；反应产物的生成速率随着底物浓度的降低而下降。随着反应时间的延长，底物的转化率会随之提高，产品产量亦会增加，但是以单位操作时间计算的产物产量并不一定增加。所以，若以单位操作时间的产物产量作为目标函数，就必然存在一个最优反应时间，而使该函数值为最大。

对一定反应 S→P：

若反应器有效体积为 V_R，辅助操作时间为 t_b，产物浓度为 c_P，则单位操作时间的产物产量为：

$$F_P = \frac{V_R c_P}{t_r + t_b} \tag{8-43}$$

使 F_P 最大的条件是其对反应时间 t_r 的导数为零，即：

$$\frac{dF_P}{dt_r} = \frac{V_R\left[(t_r + t_b)\dfrac{dc_P}{dt_r} - c_P\right]}{(t_r + t_b)^2} = 0 \tag{8-44}$$

所以：

$$\frac{dc_P}{dt_r} = \frac{c_P}{t_{r,opt} + t_b} \tag{8-45}$$

式中：$t_{r,opt}$ 为最优反应时间（s）。

式（8-45）即为单位时间产物产量为最大的必要条件，由此可求出最优反应时间 $t_{r,opt}$。求法可用解析法或图解法，后者较方便。下面用图解法求解。

首先作出反应时间 t_r 与 c_S 的关系曲线，并将其换算为 t_r 与 c_P 的关系曲线，如图 8-4 所示。过原点沿横轴负方向截取 $OA = t_b$，然后自 A（$-t_b$，0）作 $c_P - t$ 曲线的切线 AB，则 B 点所对应的时间即为最优反应时间。由图中可以看出，最优反应时间下产物浓度为 $c_{p,opt}$，切线 AB 的斜率也等于 dc_P/dt_r。

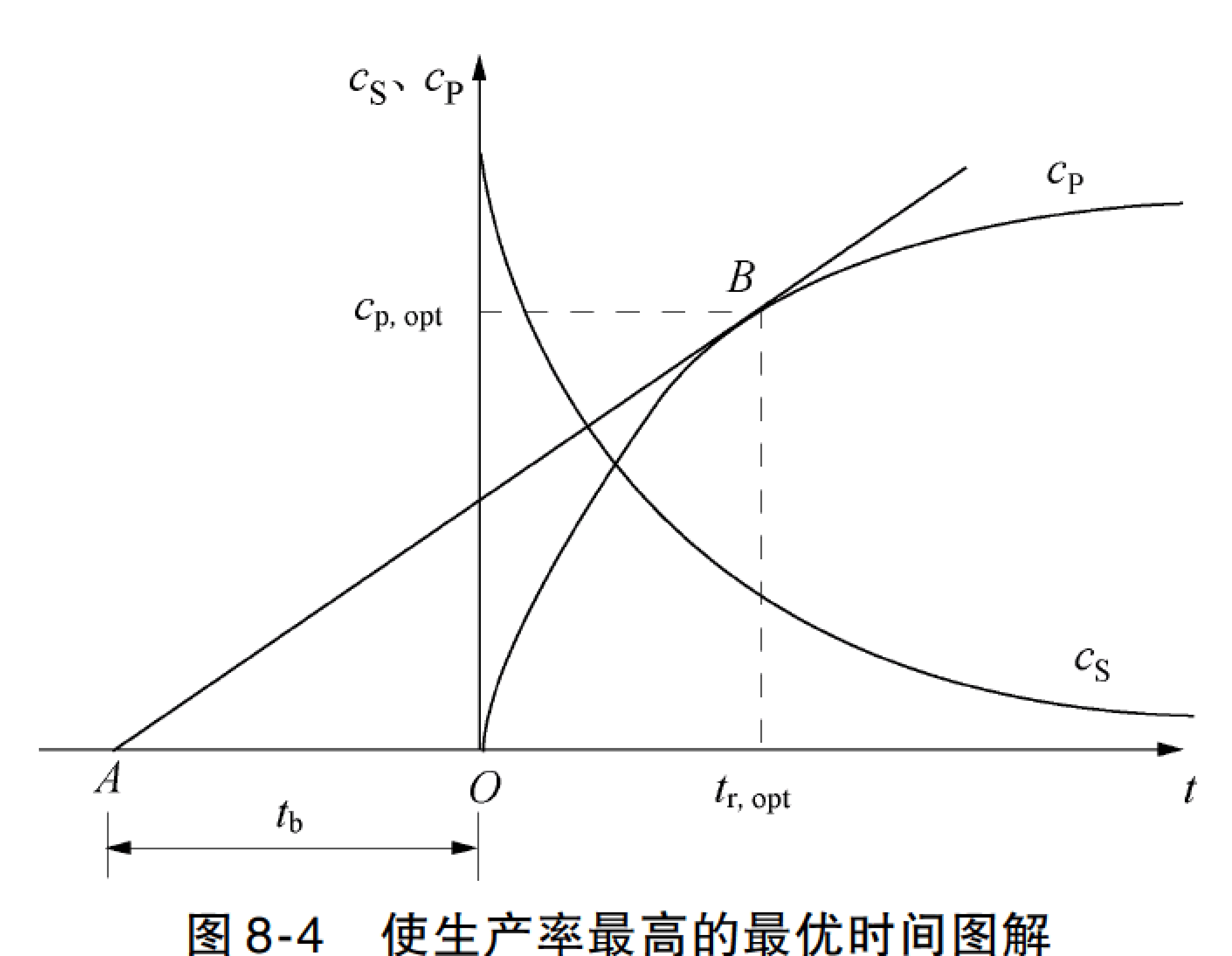


图 8-4 使生产率最高的最优时间图解

需要指出的是，上述结果是以单位时间产物产量最大为目标函数的，如果以消耗原料

最少作为目标函数，则反应时间愈长，原料消耗愈少。因此，优化目标函数不同，结果也就不同，这一点务必注意。综合考虑各方面的因素，应以生产费用最低作为优化目标函数较适宜。若设单位时间内反应操作费用为 a_r，辅助操作费用为 a_b，固定资产折旧费为 a_f，产物浓度为 c_P，则单位质量产物的总费用（c_T）为

$$c_T = \frac{a_r t_r + a_b t_b + a_f}{V_R c_P} \tag{8-46}$$

要使生产成本最低，应使 $dc_T/dt_r = 0$。

$$\frac{dc_T}{dt_r} = \frac{1}{V_R c_P^2}\left[a_r c_P - (a_r t_r + a_b t_b + a_f)\frac{dc_P}{dt_r}\right] = 0 \tag{8-47}$$

则：

$$\frac{dc_P}{dt_r} = \frac{c_P}{t_{r,opt} + (a_b t_b + a_f)/a_r} \tag{8-48}$$

采用和图 8-4 相同的方法求出 $t_{r,opt}$ 值。

对某些简单的反应，还可用解析法求出最佳反应时间。

假定某反应服从 M－M 方程，且不考虑酶的失活，产物初始浓度 $c_{P_0}=0$，则有：

$$r_P = \frac{dc_P}{dt_r} = \frac{r_{max} c_{S,opt}}{K_m + c_{S,opt}} = \frac{c_{S_0} - c_{S,opt}}{t_{r,opt} + t_b} \tag{8-49}$$

式中：$c_{S,opt}$ 为最佳基质浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

若以转化率表示，　$c_{S,opt} = c_{S_0}(1 - X_{S,opt})$

代入式（8-49）得到：

$$r_{max}(t_{r,opt} + t_b) = X_{S,opt}\left(c_{S_0} + \frac{K_m}{1 - X_{S,opt}}\right) \tag{8-50}$$

又因为对 M－M 方程，有式（8-8），将其代入式（8-50），经整理可得下式：

$$r_{max} t_b = K_m\left(\frac{X_{S,opt}}{1 - X_{S,opt}} + \ln\frac{1}{1 - X_{S,opt}}\right) \tag{8-51}$$

根据式（8-51）确定最佳转化率 $X_{S,opt}$ 值，再代入式（8-50），进而求出 $t_{r,opt}$ 值。

8.3　连续反应过程

1949 年莫诺改变了分批反应过程，建立了连续反应过程。所谓连续反应过程，即是以一定速率不断地向混合均匀的反应器中供给新鲜的基质，同时等量地排出反应液，维持反应器中液量一定的培养方法。理论上，连续反应过程可无限制地进行下去。与培养环境不断变化的分批反应过程不同，在连续反应过程中，酶或者是细胞所处的环境条件如底物浓度、产物浓度、pH、细胞浓度等可不随时间的变化而改变，保持稳定状态。因此应用连续反应过程，使用各种限制性培养技术，就可以建立起高度选择性的培养环境，这就为研究酶或者微生物对环境因子的响应、在最佳环境条件下取得最好的培养结果提供了一种独特的研究工具和方法。因此连续反应过程在生物化学工程领域日益受到重视和被广泛地应用。

8.3.1　连续过程的动力学特点

连续反应过程在反应开始阶段经历反应条件发生变化的过渡期，然后由于以相同的速率连续进料和出料，反应条件达到稳定态，如图 8-5 所示。这种反应条件和系统的状态不随时

间变化的特性是连续反应过程与分批反应过程和半分批半连续反应过程的主要差别。因此，连续反应过程在以下各点表现其优越性。

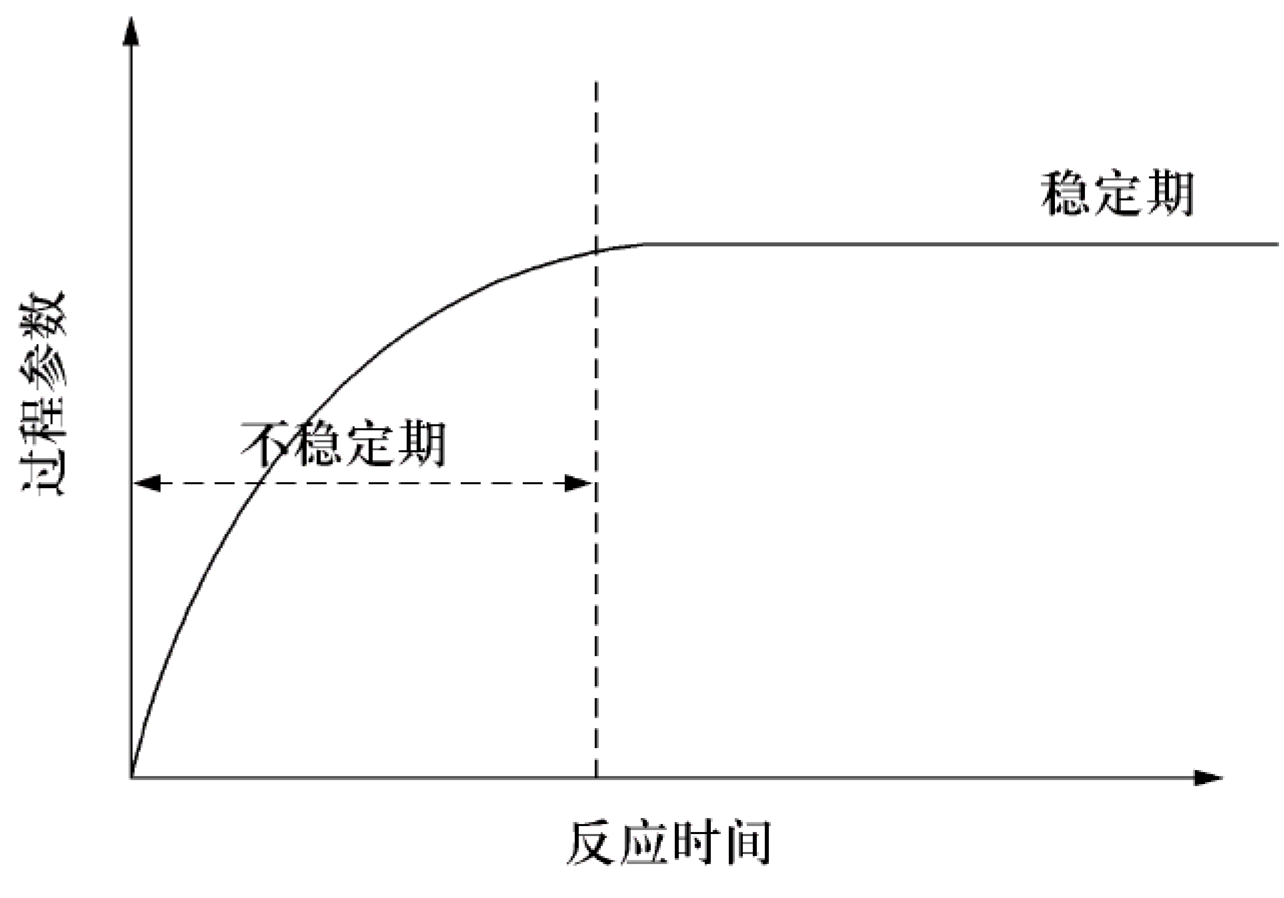


图 8-5 连续反应过程的状态变化

（1）连续反应过程有利于过程的研究与分析：由于以保持过程的变量与参数始终恒定的目的进行操作，因此可以通过确定比较基准，对反应系统的任何变量或参数的微小变化作出估计。例如，对细胞培养过程，通过改变生长限制性营养物组成，就可研究细胞组成和代谢活性的变化。连续反应的稳定态也为通过质量平衡测定反应动力学参数和速率提供方便。

（2）对连续反应可进行高效的过程控制：对细胞培养过程，连续培养时通过调节营养物的加入速率，可以调节细胞的生长、代谢产物的生成速率和控制细胞浓度。在连续培养时，可以向反应器内不断加入新鲜的营养物，同时有害代谢产物不断被稀释排出，培养过程可连续稳定地进行下去。对混合菌的培养过程，采用分批培养难以控制各种细胞的相对含量，而连续培养则有可能维持其不变。

（3）连续反应过程的产品质量稳定：由于进行稳定态操作，反应条件稳定，因此可以避免分批操作的各批次间的差别，以控制产品质量。

（4）连续反应过程的生产效率较高：相对分批反应过程，连续反应过程没有辅助操作时间，并且可选择反应速率最大时的反应条件，因此单位反应体积的产物生成速率可达到最大。由于连续操作效率较高，控制稳定，操作费用也较低。

连续反应过程也存在一些缺点：例如，它对细胞生长时同步产生的代谢副产物的生成不能控制；操作周期过长，容易受到杂菌污染；需要使用费用较高的检测手段和控制设备等。

生物反应器使用连续操作的主要目的是利用其产品质量稳定、生产效率较高、适合于大批量生产的特点。已成功应用的典型例子有：使用气升式反应器的大规模单细胞蛋白的生产、固定化葡萄糖异构酶催化的高果糖浆的生产、对废水的生物处理过程。

8.3.2 连续反应过程的动力学响应（过程参数变化对平衡的影响）

1. 理想流动反应器模型 根据连续操作反应器中物料的流动情况，可建立两种理想流动反应器模型，即全混流反应器（CSTR）和平推流反应器（CPFR）。前者是连续操作的机械搅拌槽式反应器的理想模型，而后者的实际反应器型式有连续操作的管式反应器、管式固定床反应器和气体搅拌的塔式反应器等。以下分别介绍这两种反应器模型及其基本设计方程。

全混流反应器模型的主要特征是：在以相同的速率稳定地进料和出料的条件下，反应器有效体积、反应物系组成均不随时间发生改变，反应物料在空间上达到完全混合，并且与出

料组成相同（图 8-6）。

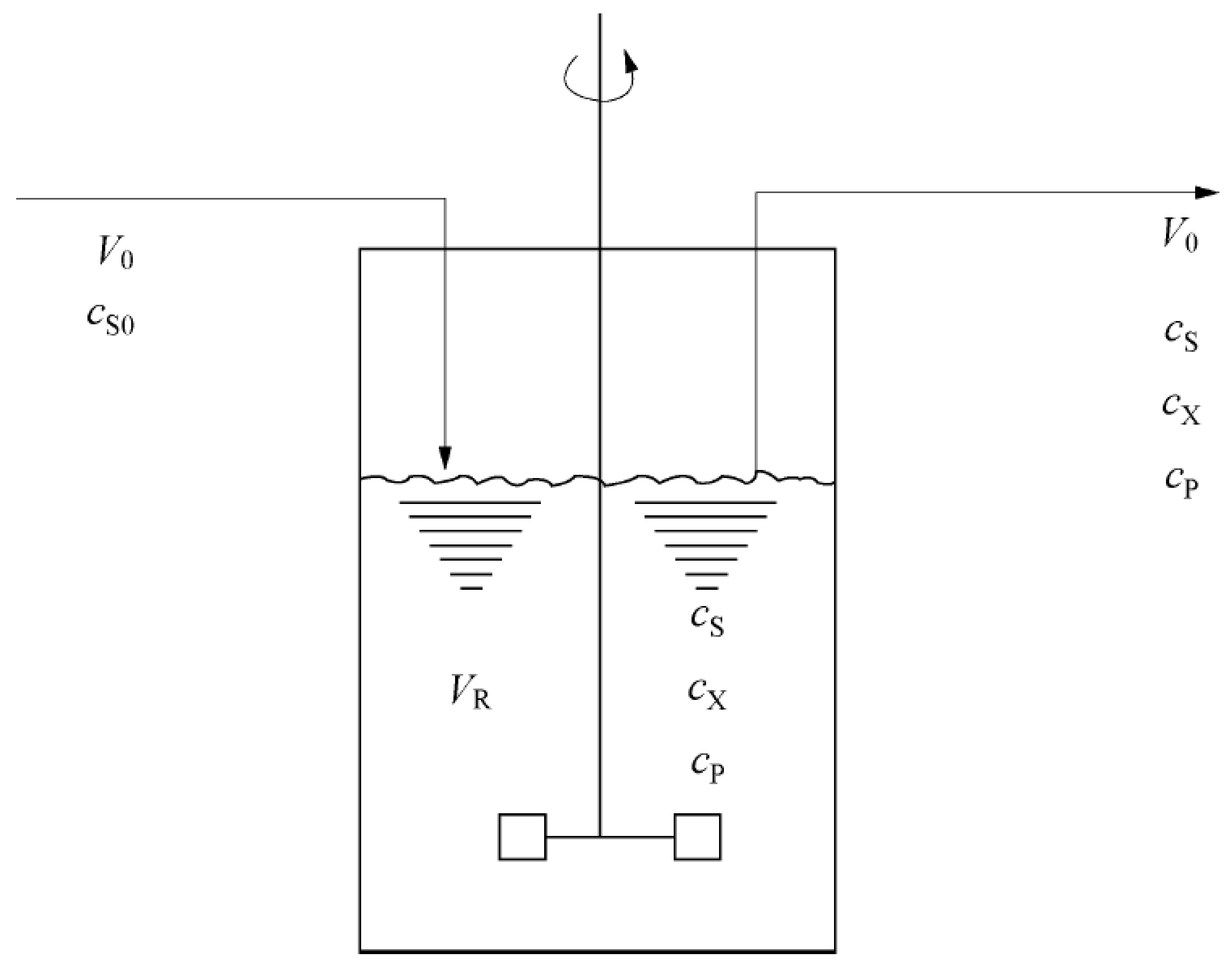


图 8-6　全混流反应器模型

假定 CSTR 中进行等温均相反应，反应器有效体积恒定不变，其基本设计方程为：

流入速率 = 流出速率 + 反应消耗速率 + 累积速率

对底物 S 的物料衡算式为：

$$V_0 c_{S_0} = V_0 c_S + r_S V_R + \frac{dc_S}{dt} V_R \tag{8-52}$$

式中：V_0 为进料流量（$L \cdot s^{-1}$）；c_{S_0}、c_S 为进料、反应器中的底物浓度（$g \cdot L^{-1}$）；V_R 为反应器有效体积（L）。

在连续稳定态时，$\frac{dc_S}{dt} = 0$，由式（8-52）可得：

$$\tau_m = \frac{V_R}{V_0} = \frac{c_{S_0} - c_S}{r_S} \tag{8-53}$$

式中：τ_m 为 CSTR 的空时，等于物料在反应器中的平均停留时间（s）。

空时的倒数称为空速（s^{-1}），表示单位反应器体积的物料处理量。

在已知某反应的动力学方程时，以反应速率的倒数与 c_S 作图，式（8-53）图解积分计算如图 8-7 所示。图中阴影面积等于空时 τ_m 。

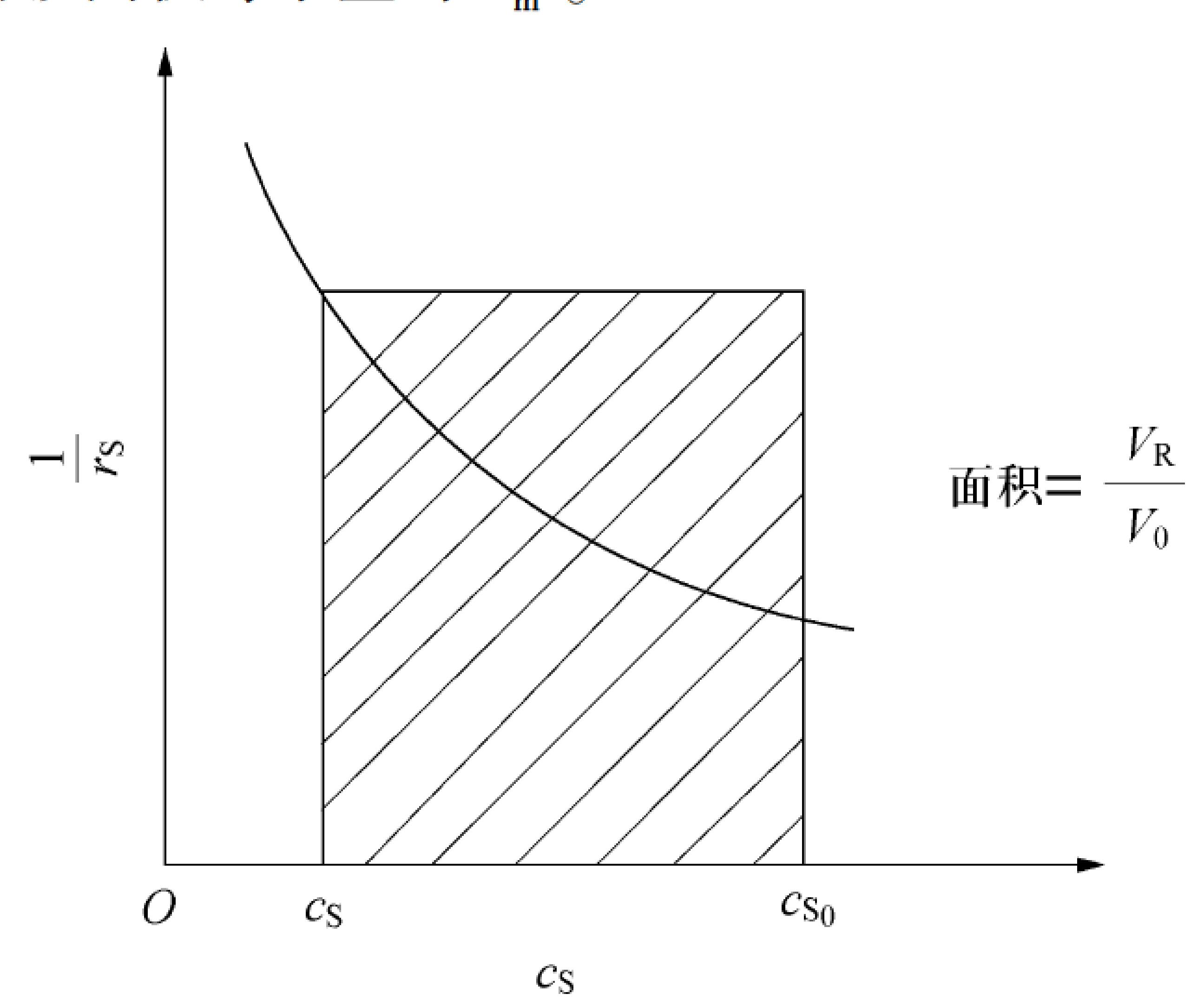


图 8-7　CSTR 设计式的图示

平推流反应器模型的特征是：流体微元在反应过程中沿流动方向以相同的速度向前移动，与流动方向垂直的截面上物料的组成均一，反应器内的参数不随时间变化（图 8-8）。

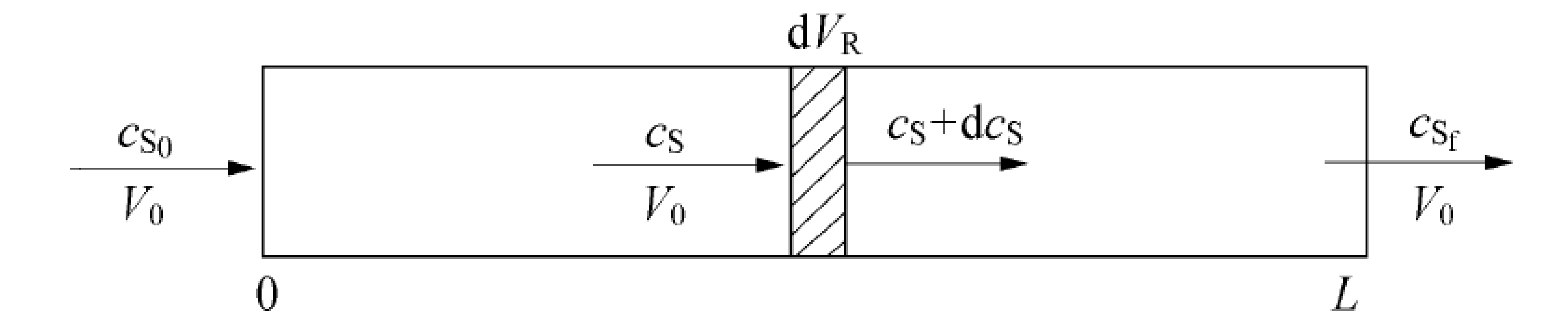


图 8-8　平推流反应器模型

CPFR 的物料衡算需考虑反应器中组分浓度在流动方向上的变化，若在流动方向上取长度为 dl、体积为 dV_R 的微元体对底物做物料衡算，则有：

$$V_0 c_S = V_0(c_S + dc_S) + r_S dV_R + \frac{dc_S}{dt} dV_R \tag{8-54}$$

连续定态操作时，$\frac{dc_S}{dt} = 0$，于是：

$$-V_0 dc_S = r_S dV_R$$

对整个反应器，有：

$$-\int_{c_{S_0}}^{c_{S_f}} \frac{dc_S}{r_S} = \int_0^{V_R} \frac{1}{V_0} dV_R \tag{8-55}$$

即：

$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = \int_{c_{S_f}}^{c_{S_0}} \frac{dc_S}{r_S} \tag{8-56}$$

式中：τ_P 为 CPFR 的空时，等于物料在 CPFR 中的平均停留时间（s）。

对式（8-56）的图解积分计算，如图 8-9 所示。图中阴影面积等于空时 τ_P。

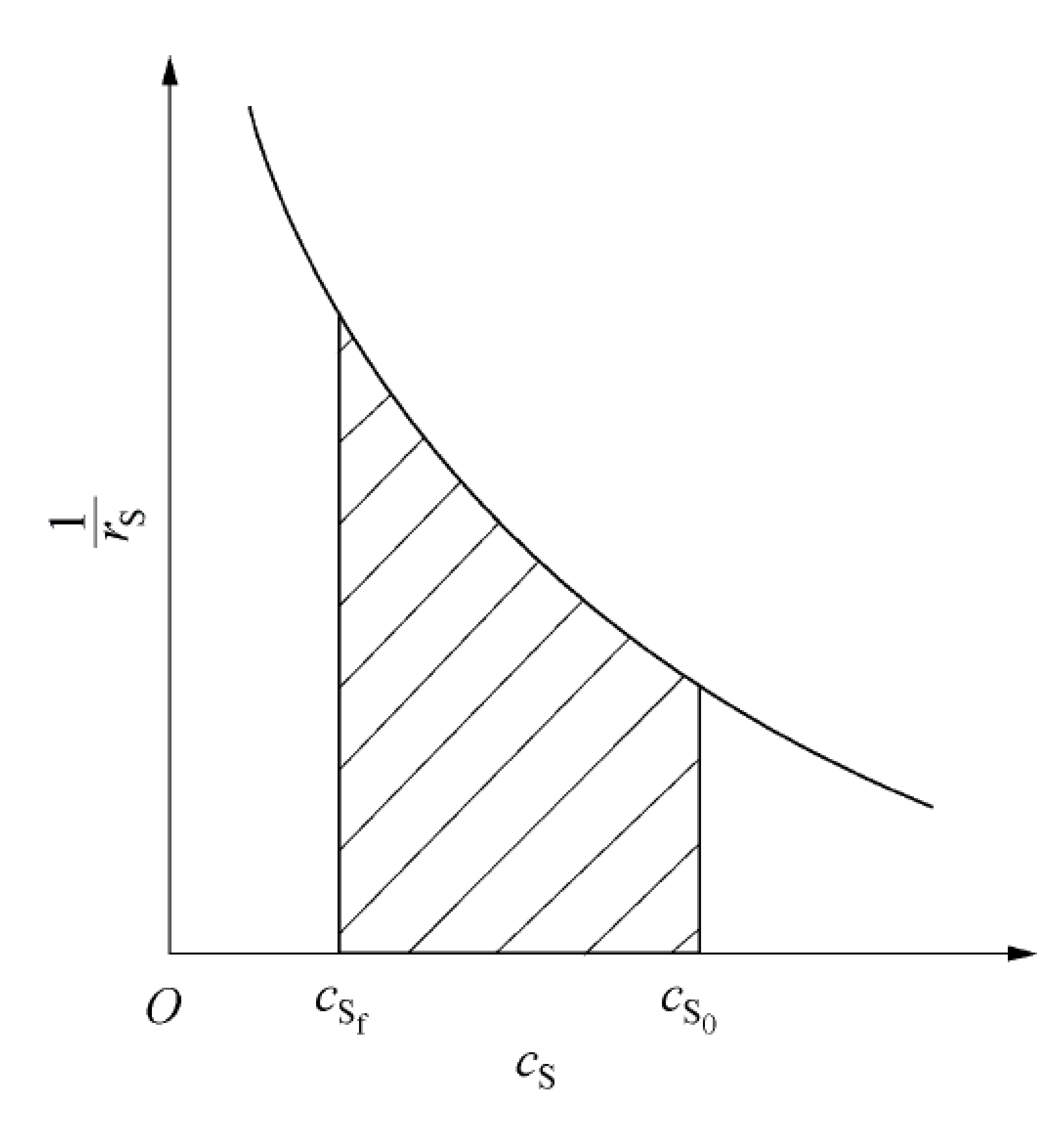


图 8-9　CPFR 设计式图示

从上述两种模型方程可见，由于 CSTR 和 CPFR 的流动状态不同，两者表现出不同的操作特性。这种差别的原因是不同的流动状态造成反应器内物料的混合状况不同，如图 8-10 所示。对全混流反应器，进入反应器的反应物与反应器内主体物料发生混合，组分浓度被稀释。而对平推流反应器，由于在流动方向上不存在流体微元体的反向混合，底物浓度由反应器进口的最高值逐渐降低为出口的最低值，组分浓度仅受反应的影响。

对理想流动反应器的流动混合，可以从流体微元体停留时间分析。在全混流反应器中，刚进入反应器的新鲜物料与存留在器内的物料以不同的停留时间瞬间达到完全混合，各个微元体在反应器中停留时间并不都相同，形成了停留时间分布。这种停留时间不同的微元体之间的混合，一般称为返混。全混流反应器的返混达到最大。对平推流反应器，通过反应器的微元体沿同一方向以相同的速度向前移动，所有微元体在反应器中的停留时间都相同，因此平推流反应器的返混为零（图 8-10）。实际的连续操作生物反应器中并不具有这两种极端的流动与混合特性，但是对理想流动反应器的操作特性的分析却是实际生物反应器的设计基础。

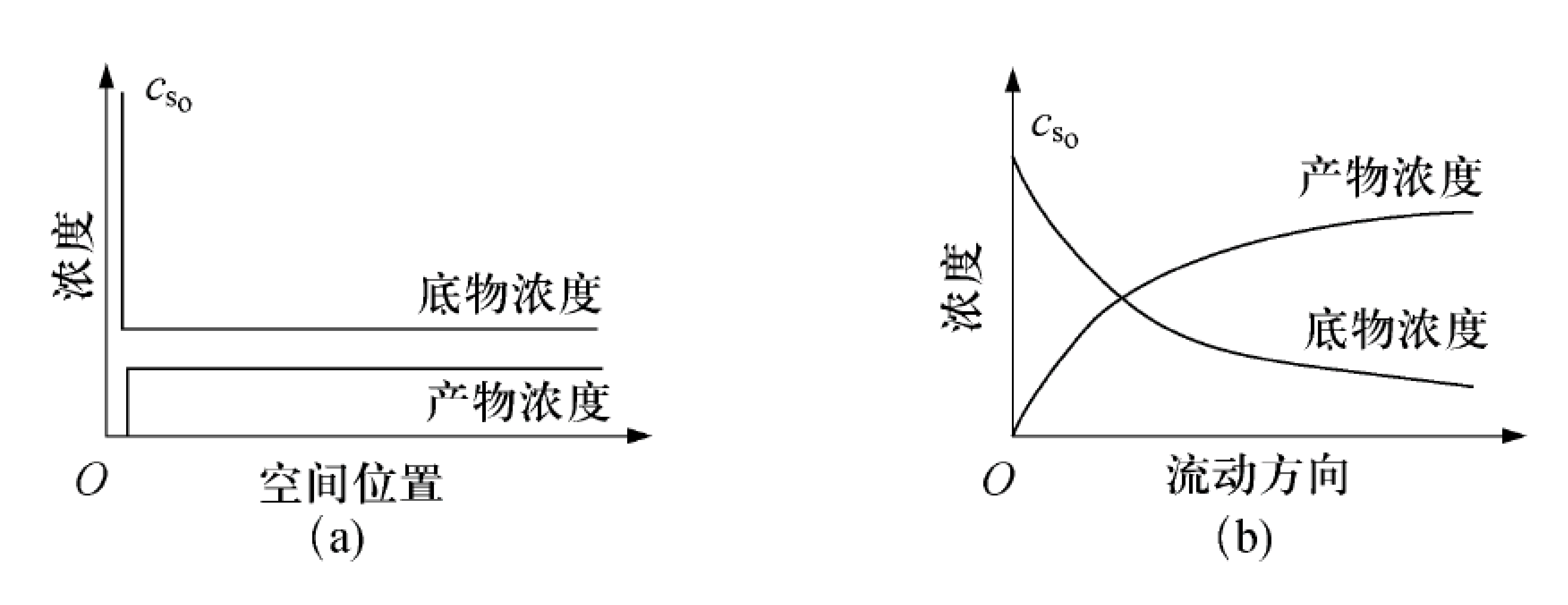


图 8-10　全混流反应器和平推流反应器中的浓度分布

（a）全混流反应器；（b）平推流反应器

2. 酶反应时的单级 CSTR　在 CSTR 中进行的酶反应过程，反应器的操作特性取决于酶反应的动力学特性。对一定的反应，若反应器中总酶量一定，反应的空时主要取决于反应条件、底物的初始浓度和酶浓度。

对均相酶反应，若其动力学符合 M－M 方程，将其动力学方程代入式（8-53），计算可得：

$$r_{\max}\tau_{m} = (c_{S_0} - c_S) + K_m \frac{c_{S_0} - c_S}{c_S} \tag{8-57}$$

若以底物的转化率 X_S 表示，式（8-57）可变为

$$r_{\max}\tau_{m} = c_{S_0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S} \tag{8-58}$$

对底物抑制的酶反应，则有：

$$r_{\max}\tau_{m} = c_{S_0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S} + \frac{c_{S_0}^2}{K_{SI}}(X_S - X_S^2) \tag{8-59}$$

式中：K_{SI} 为底物抑制的解离常数（$mol \cdot m^{-3}$）。

若为竞争性产物抑制，则为

$$r_{\max}\tau_{m} = c_{S_0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S} + \frac{K_m}{K_P} \times \frac{c_{S_0}X_S^2}{1 - X_S} \tag{8-60}$$

式中：K_P 为产物抑制的解离常数（$mol \cdot m^{-3}$）。

若为非竞争性产物抑制，则为

$$r_{\max}\tau_{m} = c_{S_0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S} + \frac{K_m}{K_P} \times \frac{c_{S_0}X_S^2}{1 - X_S} + \frac{c_{S_0}^2 X_S^2}{K_P} \tag{8-61}$$

如果为固定化酶反应，由于有液固两相和内扩散的影响存在，底物的物料平衡式为

$$V_0 c_{S_0} = V_0 c_S + (1 - \varepsilon_L) V_R \eta_T r_{SP} \tag{8-62}$$

式中：r_{SP} 为以固定化酶颗粒体积为基准所定义的催化反应速率；ε_L 为液相体积分数；η_T 为固定化酶总有效因子。

$$\tau_m = \frac{V_R}{V_0} = \frac{c_{S_0} - c_S}{(1 - \varepsilon_L)\eta_T r_{SP}} \tag{8-63}$$

当 r_{SP} 仍符合 M－M 动力学时，则式（8-63）可表示为

$$r_{max}\tau_m(1 - \varepsilon_L)\eta_T = c_{S_0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S} \tag{8-64}$$

由于反应器中有效体积包括液相体积 V_L 和固定化酶体积 V_S，所以 $V_R = V_L + V_S$，因此空时 $\tau_m = \tau_L + \tau_S$，其中液相停留时间 τ_L 的计算式为

$$\tau_L = \varepsilon_L \tau_m \tag{8-65}$$

如果反应速率以固定化酶单位质量为基准，则有：

$$\tau_m = \frac{W}{V_0} = \frac{c_{S_0}X_S}{\eta r_{SW}} \tag{8-66}$$

式中：τ_m 为空时；r_{SW} 为以固定化酶质量为基准定义的催化反应速率。

3. 细胞反应时的单级 CSTR

（1）简单的单级 CSTR 操作特性：在进行细胞反应时，根据达到稳定状态的方式不同，此种形式的连续反应过程可分为两种：一种是在没有任何反馈控制机构时，以一定不变的流量供给培养基，通过细胞自身的催化的性质而达到稳定的操作状态。其特征是营养物浓度保持不变。这种控制方式也称为外部控制。另一种方式是在有反馈控制机构条件下，控制培养基的加料速率，以维持反应器内细胞浓度为一定。前者常称为恒化器，后者常称为恒浊器。由于前者控制简单，在实际应用中占绝大多数。

在 CSTR 中进行细胞反应时，过程能够达到稳定操作的原因：一方面是细胞的自催化特性；另一方面是 CSTR 的返混性质。因此，只要反应器内有细胞存在，即使加入的培养基中不含有细胞，在一定的加料流量范围内，细胞就能生长并达到稳态。

对单级 CSTR 的连续培养，假定培养液混合均匀，则通用衡算方程为

细胞：　　流出＝流入＋生长＋累积量

底物：　　流出＝流入－消耗＋累积量

产物：　　流出＝流入＋生成＋累积量

因此有以下衡算方程组

细胞：
$$\frac{d(c_X V_R)}{dt} = V_0(c_{X_0} - c_X) + r_X V_R \tag{8-67}$$

底物：
$$\frac{d(c_S V_R)}{dt} = V_0(c_{S_0} - c_S) - r_S V_R \tag{8-68}$$

产物：
$$\frac{d(c_P V_R)}{dt} = V_0(c_{P_0} - c_P) + r_P V_R \tag{8-69}$$

连续培养在稳定态操作时一般体积不发生变化，即：

$$\frac{dV_R}{dt} = 0 \tag{8-70}$$

于是上述各式可变为

$$\frac{dc_X}{dt} = D(c_{X_0} - c_X) + r_X \tag{8-71}$$

$$\frac{dc_S}{dt} = D(c_{S_0} - c_S) - r_S \tag{8-72}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = D(c_{P_0} - c_P) + r_P \quad (8\text{-}73)$$

式中：D 为稀释率（s^{-1}或 h^{-1}）。

稀释率为加料流量 V_0 与反应器有效体积之比，也就是空速，即：

$$D = \frac{V_0}{V_R} \quad (8\text{-}74)$$

由于单级 CSTR 的连续培养多以恒化器方式操作，故以下主要讨论恒化器的操作特性。

简单反应时 CSTR 的操作特性：当 $c_{X_0} = 0$ 时，由式（8-71）可得细胞的质量衡算式为：

$$\frac{dc_X}{dt} = (\mu - D)c_X \quad (8\text{-}75)$$

式中：μ 为细胞的比生长速率（h^{-1}）。

又由稳态条件，$\frac{dc_X}{dt} = 0$，于是由式（8-75）可得：

$$\mu = D \quad (8\text{-}76)$$

式（8-76）具有重要意义，它表示了恒化器的主要操作特性，即恒化器稳定态时细胞生长比速率与稀释率相等。这表明，在连续培养时，通过改变培养基的加入速率就可控制细胞的生长速率。比生长速率是细胞的生长特性，在分批培养中一般无法人为控制，而稀释率是反应器的操作特性，$\mu = D$ 表明可以改变供给培养基的流量，对细胞的比生长速率 μ 加以控制。在 CSTR 中，反应器的操作特性与细胞的生长特性联系在一起，因此可以利用 CSTR 对微生物进行生理学以及遗传学方面的研究，以定量地解析环境因素在生理学、生物化学以及遗传学方面对微生物的影响，这是 CSTR 的一个很重要的应用。

如果细胞的生长符合 Monod 形式，式（8-76）可表示为

$$D = \mu = \mu_{max}\frac{c_S}{K_S + c_S} \quad (8\text{-}77)$$

所以，恒化器培养时底物浓度 c_S 可由式（8-78）计算，即：

$$c_S = \frac{K_S D}{\mu_{max} - D} \quad (8\text{-}78)$$

细胞浓度的计算式为

$$c_X = Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S) \quad (8\text{-}79)$$

由式（8-78）可得：

$$c_X = Y_{X/S}\left(c_{S_0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right) \quad (8\text{-}80)$$

CSTR 中稀释率对底物浓度 c_S 和细胞浓度 c_X 的影响见图 8-11。

从图中可以看出，当 D 值较小时，随着 D 的增加，c_S 逐渐在增加，当 D 值较大时，c_S 将迅速上升，当 D 达到某一值（即临界稀释率 D_C）时，$c_S = c_{S_0}$，流出反应器的物料中基质浓度等于流入反应器的物料中基质浓度，此为 CSTR 的操作上限。

对 c_X 与 D 的关系，当 D 值较小时，反应器内细胞浓度较高，随 D 的增加，c_X 在逐渐下降，当 D 增大到临界值 D_C 时，$c_X = 0$，流出反应器的物料中已无细胞。

临界稀释率 D_C：当 CSTR 达到稳态操作时，$\mu = D$，但是，要达到稳态操作有一前提条件，即不能超过连续培养系统的临界稀释率。所谓临界稀释率，即流出反应器的物料中基质浓度等于流入反应器的物料中的基质浓度，此时的稀释率称为临界稀释率 D_C。

$$D_C = \mu_{max}\frac{c_S}{K_S + c_{S_0}} \quad (8\text{-}81)$$

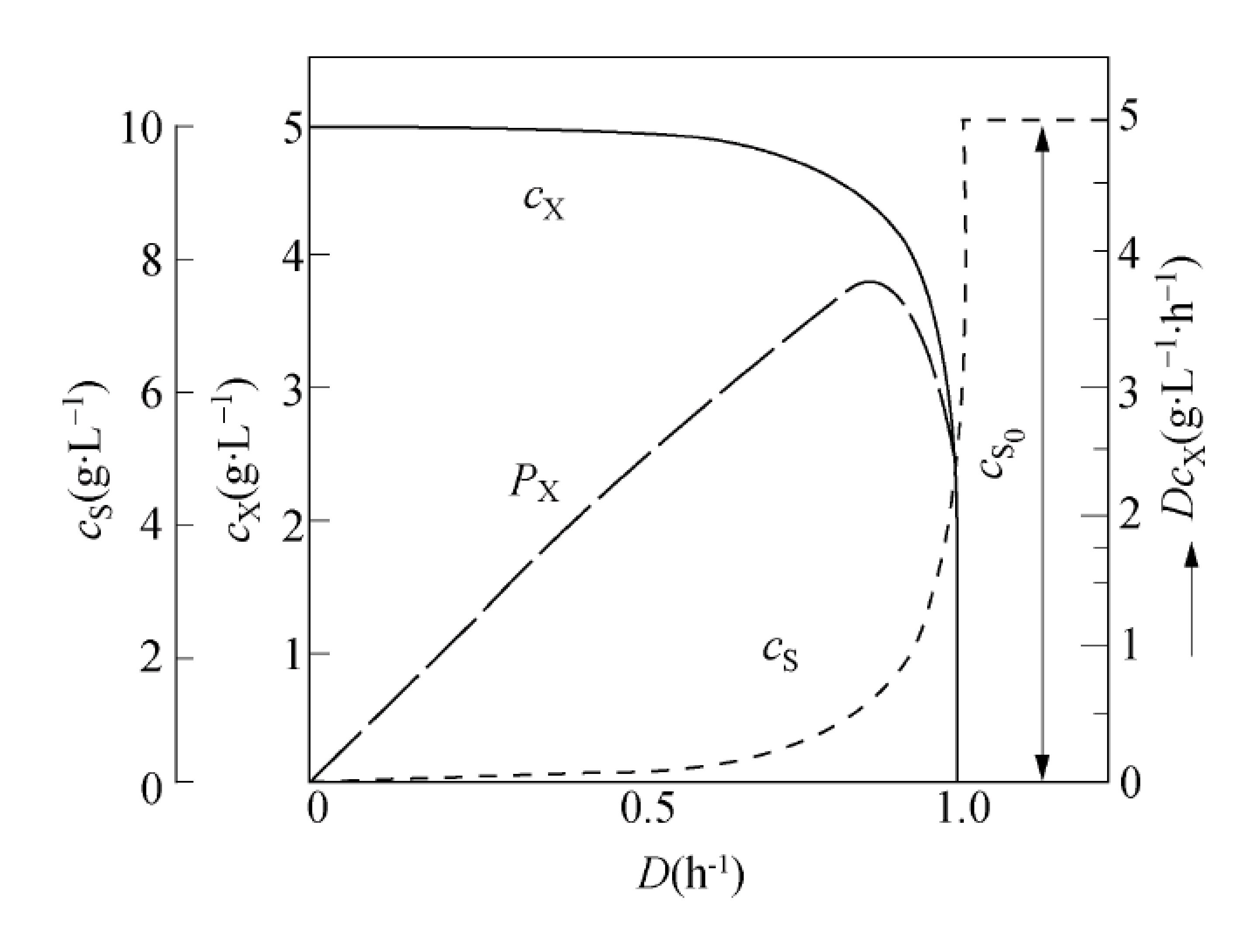


图 8-11　恒化器操作特性示意图

在 CSTR 中，随着 D 的增大，流出反应器的物料中基质浓度逐渐增大，当 $c_S = c_{S_0}$ 时，生物反应尚未来得及进行，基质已被冲出反应器，CSTR 的出口物料中以及反应器内的细胞浓度为零，此时的操作已失去了实际意义，此时的操作状态称为“洗出”状态。只有在临界稀释率以下，反应器才能达到稳定操作状态，相应于临界稀释率 D_C 的临界比生长速率 μ_C：

$$\mu_C = D_C = \mu_{max}\frac{c_{S_0}}{K_S + c_{S_0}} \tag{8-82}$$

以上讨论了 Monod 动力学恒化器操作特性，但不少实际过程对这种理想的情况有偏离，原因包括非理想混合、底物和产物抑制、氧对细胞生长的限制、细胞维持代谢和死亡、在反应器壁上的黏附等情况。这些影响作用均使恒化器的操作效率下降。

（2）底物抑制时 CSTR 的操作特性：在细胞生长受到底物抑制时，只有当稀释率明显降低时，连续操作才能进行。

如对竞争性底物抑制：

$$D_C = \mu_{max}\frac{c_{S_0}}{K_S\left(1 + \dfrac{c_{S_0}}{K_{SI}}\right) + c_{S_0}} \tag{8-83}$$

有抑制时的临界稀释率 D_C 要比无抑制时低。

对反竞争性底物抑制，不但临界稀释率 D_C 较低，而且存在多种操作稳定态的问题。现在研究以获得最大比生长速率为目标进行连续培养的情况。

细胞达到最大生长比速率的稀释率可由稳态条件求得，即：

$$D = \mu_{max}\frac{c_{S,opt}}{K_S + c_{S,opt} + \dfrac{c_{S,opt}^2}{K_{SI}}} \tag{8-84}$$

相应的底物浓度为

$$c_{S,opt} = \sqrt{K_S K_{SI}} \tag{8-85}$$

或

$$c_{S,opt} = \frac{1}{2}\left\{\left(\frac{\mu_{max}}{D} - 1\right)K_{SI} + \sqrt{\left(\frac{\mu_{max}}{D} - 1\right)^2 K_{SI}^2 - 4K_S K_{SI}}\right\} \tag{8-86}$$

在此稀释率条件下对底物的质量衡算可得：

$$D(c_{S_0}-c_{S,opt})=r_S \tag{8-87}$$

式（8-87）为培养液中底物浓度为 $c_{S,opt}$ 时的操作特性方程。对底物浓度为 c_S 的一般情况，式（8-87）中 $c_{S,opt}$ 变为 c_S。因此应该可从 $D(c_{S_0}-c_S)-c_S$ 与 r_S-c_S 函数关系得到稳态操作点（图 8-12 中 c_{SI} 为底物消耗速率最大时的底物浓度）。

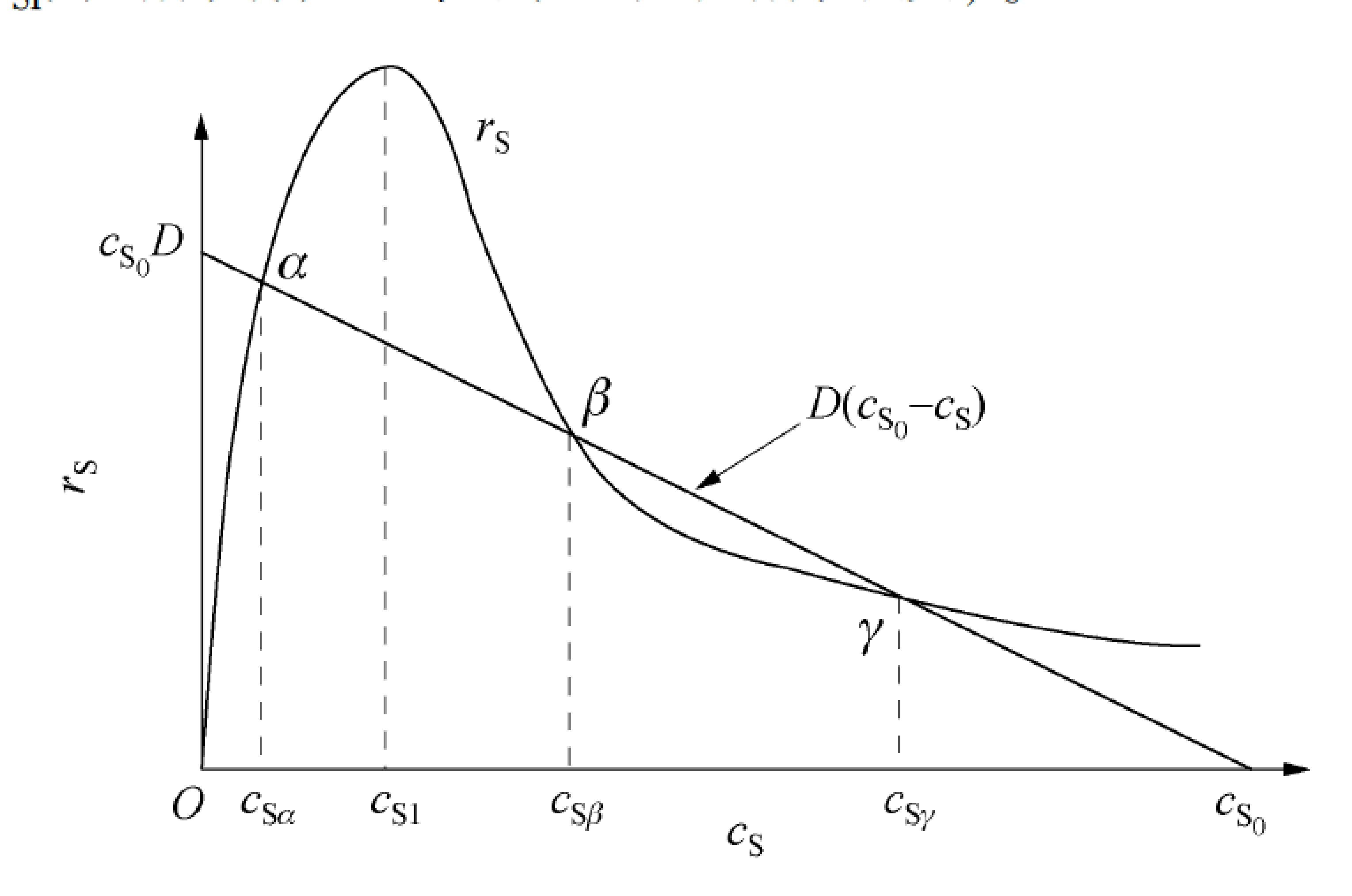


图 8-12　反竞争性底物抑制细胞生长的连续培养的稳定态

图 8-12 中直线表示 $D(c_{S_0}-c_S)-c_S$ 关系，曲线表示 r_S-c_S 关系。两者的交叉点 α、β 和 γ 为操作的稳定态，所对应的底物浓度为稳定态浓度。从图中还可以看出该系统可能存在多个稳态，或者说实际上并不能完全由稀释率使反应器的底物浓度稳定于 $c_{S,opt}$。当反应器内实际底物浓度 c_S 小于定态浓度 $c_{S\alpha}$时，过程状态处于 α 点的左侧，直线位于曲线上方，即：

$$D(c_{S_0}-c_S)>r_S$$

底物消耗速率 r_S 小于其加入速率，此时过程将向 c_S 增加的状态移动，直至达到 $c_{S\alpha}$。图 8-12中操作点 α 和 γ 是稳定的，β 点是不稳定的，因为 β 点的左侧曲线位于直线上方，即：

$$D(c_{S_0}-c_S)<r_S$$

底物的消耗速率 r_S 大于底物加入速率，引起反应器内底物浓度的降低，过程将向底物浓度趋于 $c_{S\gamma}$的方向移动。在非固定化培养时，系统不可能稳定于 γ 点，因为在 $c_{S\gamma}$的浓度水平，生长速率会很低，会发生细胞的洗出。

（3）产物生成与抑制时的操作特性：对培养过程中的产物生成，可由对产物的质量平衡进行衡算，即：

$$V_0c_{P_0}+r_PV_R=V_0c_P+V_R\frac{dc_P}{dt} \tag{8-88}$$

一般情况下，$c_{P_0}=0$，在稳定态时：

$$r_P=Dc_P \tag{8-89}$$

$$c_P=\frac{r_P}{D}=\frac{1}{D}Y_{P/X}\mu c_X=\frac{q_Pc_X}{D} \tag{8-90}$$

或：
$$c_P=Y_{P/S}(c_{S_0}-c_S)=Y_{P/S}\left(c_{S_0}-\frac{K_SD}{\mu_{max}-D}\right) \tag{8-91}$$

上述推导是假定产物的生成类型属于生长相关型，产物浓度 c_P 与稀释率 D 的相互依赖关系类似于 c_X 与 D 的关系（图 8-11）。如果 q_P 与生长速率无关，则产物浓度 c_P 与稀释率 D

成反比，并且其 Dc_P 值在较宽稀释率下恒定（图 8-13（a））；如果为部分相关型，c_P 与 D 的关系见图 8-13（b）。因此，恒化器的操作特性对不同的细胞反应动力学是有所变化的。

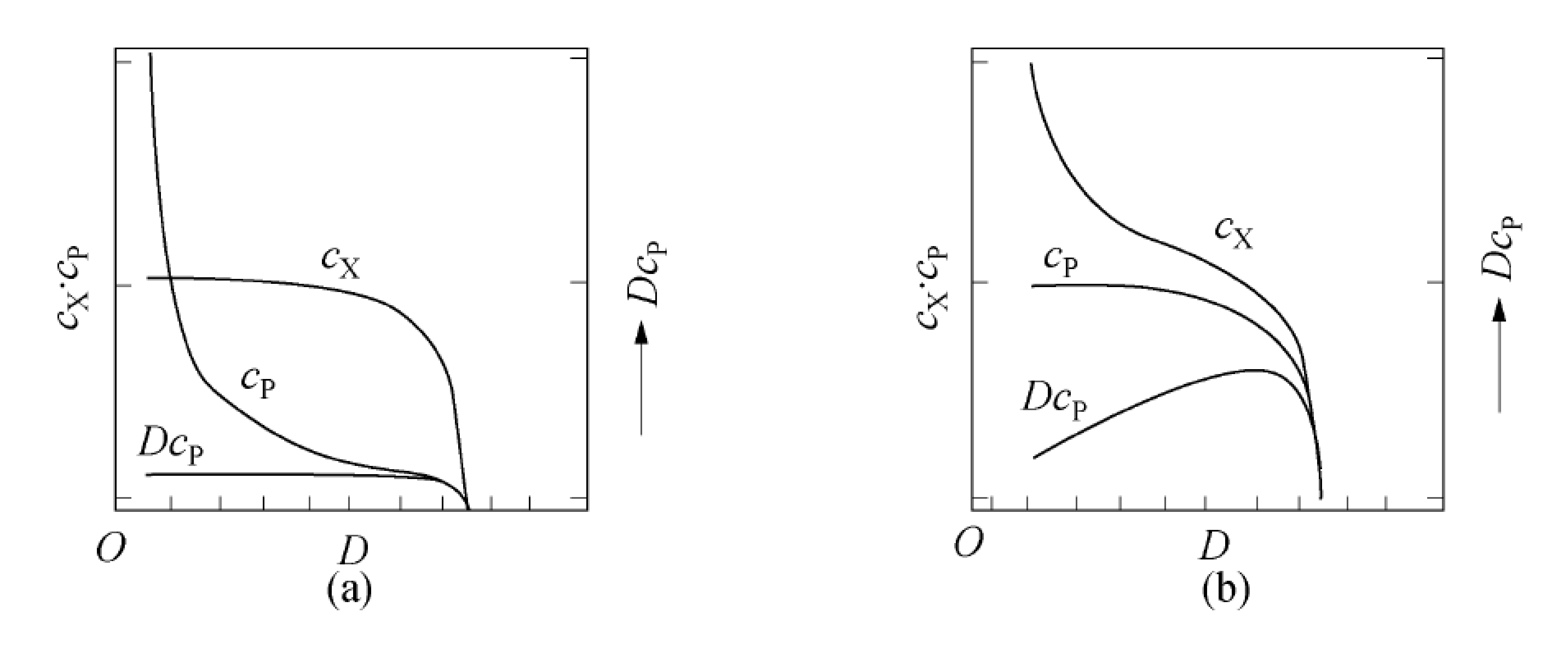


图 8-13　在 CSTR 中无产物抑制生长的 c_X、c_P 和 Dc_P 随 D 变化的曲线

（a）非生长相关型；（b）部分相关型

恒化器的操作特性不但与产物生成的动力学特性相关，而且也与产物对细胞生长的抑制机制有关。图 8-14 所示为无产物抑制与产物竞争性抑制和产物非竞争性抑制的 $c_X - D$ 的关系。从图中可以看出，在同一 D 值下，有产物抑制时，反应器中的细胞浓度要比无抑制时低。

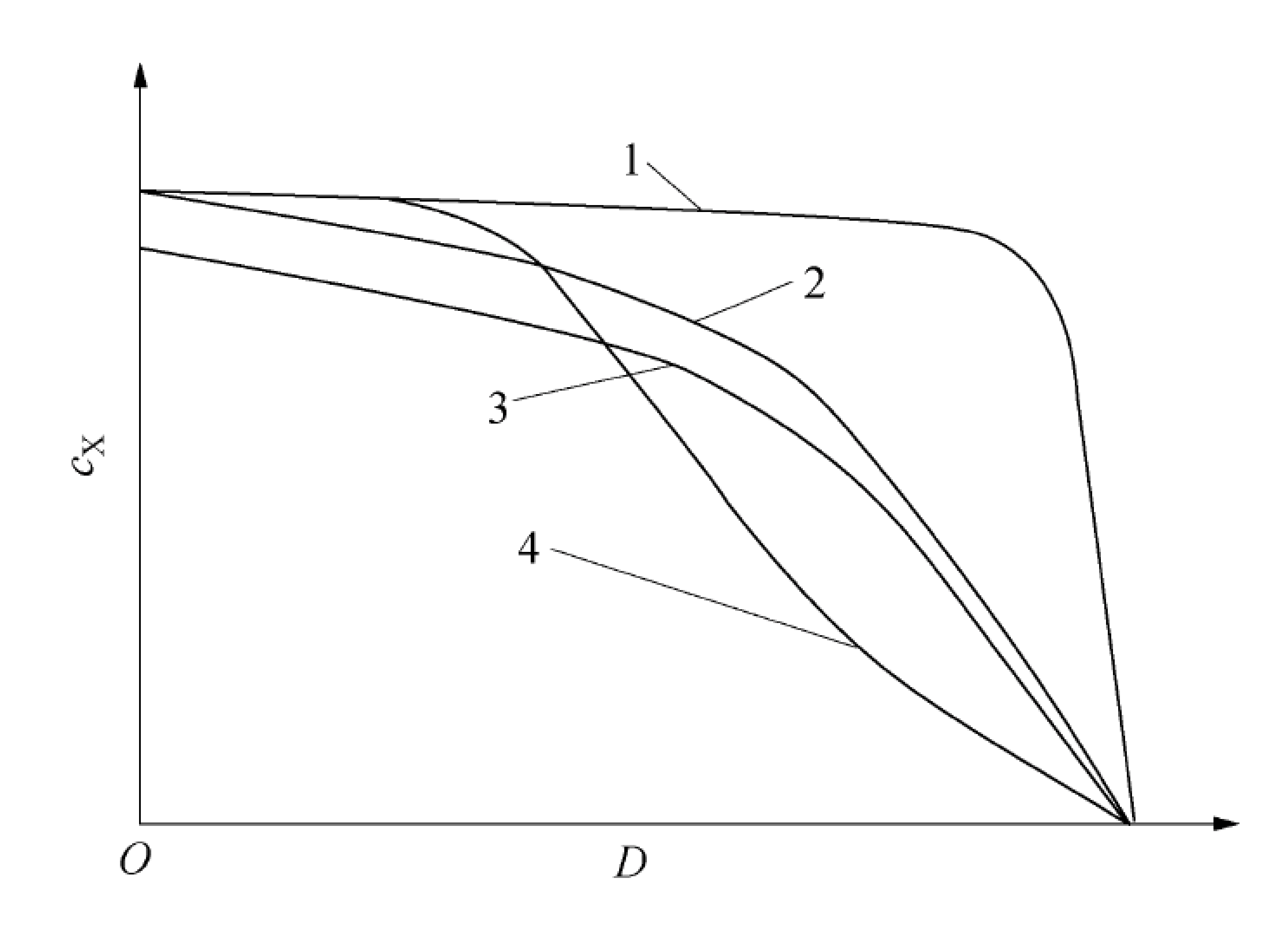


图 8-14　恒化器中无产物抑制与有产物抑制的操作特性比较

1：无产物抑制；2：产物竞争性抑制的生长相关过程；

3：产物竞争性抑制的非生长相关过程；4：产物非竞争性抑制的生长相关过程

一般对有产物抑制的恒化器操作，必须根据细胞生长的抑制动力学特性选择优化操作条件。现以产物抑制的细胞生长过程为例进行优化计算，有关衡算方程可表示为

$$\frac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = \mu_I c_X - Dc_X \tag{8-92}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t} = D(c_{S_0} - c_S) - \frac{1}{Y_{X/S}}\mu_I c_X \tag{8-93}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_P}{\mathrm{d}t} = q_P c_X - Dc_P \tag{8-94}$$

若取：

$$\mu_I = \mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{P,max}}\right) \tag{8-95}$$

则有：
$$\tau_m = \frac{1}{D} = \frac{c_P - c_{P_0}}{r_P} = \frac{c_P - c_{P_0}}{\mu_{max}\left(1 - \frac{c_P}{c_{P,max}}\right)(c_P - c_{P_0} + Y_{P/S}c_{X_0})} \tag{8-96}$$

当 $c_{P_0} = c_{X_0} = 0$，式（8-96）可简化为

$$\mu_{max}\tau_m = \frac{c_{P,max}}{c_{P,max} - c_P} \tag{8-97}$$

如果发生“洗出”现象，$c_P = 0$，则应存在：

$$(\mu_{max}\tau_m)_C = 1 \tag{8-98}$$

如果寻求最佳稀释率，则应令 $\frac{dr_P}{dc_P} = 0$，求得：

$$c_{P,opt} = \frac{1}{2}c_{P,max} \tag{8-99}$$

故
$$(\mu_{max}\tau_m)_{opt} = \frac{c_{P,max}}{c_{P,max} - \frac{1}{2}c_{P,max}} = 2 \tag{8-100}$$

$$(\mu_{max}\tau_m)_{opt} = 2(\mu_{max}\tau_m)_C \tag{8-101}$$

亦可表示为

$$(\tau_m)_{opt} = 2(\tau_m)_C \tag{8-102}$$

$$D_{opt} = \frac{1}{2}D_C \tag{8-103}$$

上述结果表示在图 8-15 中。

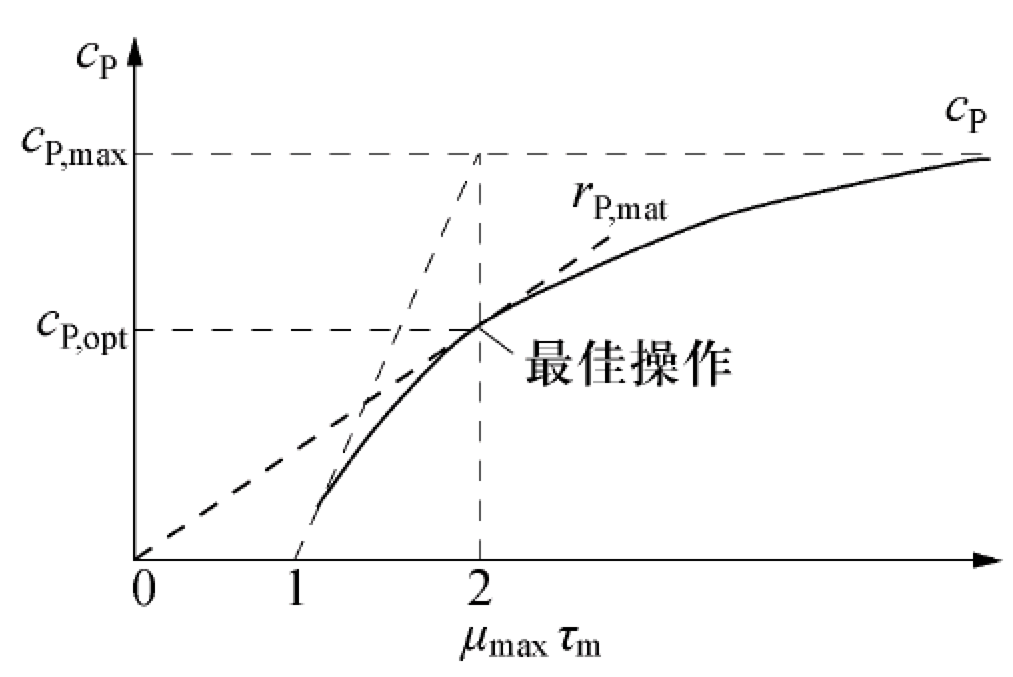


图 8-15　CSTR 中有产物抑制时最佳操作示意图

（4）考虑维持代谢或死亡的操作特性：细胞的维持代谢使底物的消耗量增加，因此细胞浓度相对没有维持代谢时降低。同样，存在细胞死亡现象时，不但底物的消耗量相对增加，并且活细胞浓度亦相对下降。

如果同时存在维持代谢和细胞死亡，对细胞衡算式为

$$\frac{dc_X}{dt} = Dc_{X_0} + (\mu - k_d - D)c_X \tag{8-104}$$

式中：k_d 为细胞死亡比速率常数（h^{-1}）。

当 $c_{X_0} = 0$ 时，式（8-104）为

$$\frac{dc_X}{dt} = (\mu - k_d - D)c_X \tag{8-105}$$

在稳态条件下，存在有：

$$D = \mu - k_d \tag{8-106}$$

或
$$\mu = D + k_d \tag{8-107}$$

对底物衡算式为

$$\frac{dc_S}{dt} = D(c_{S_0} - c_S) - \frac{1}{Y_{X/S}}\mu c_X - mc_X \tag{8-108}$$

式中：m 为细胞维持常数（h^{-1}）。

在稳态条件下，$\frac{dc_S}{dt}=0$，重新整理式（8-108）可得：

$$c_S=\frac{K_S(D+k_d)}{\mu_{max}-D-k_d} \tag{8-109}$$

$$c_X=\frac{Y_{X/S}D}{D+k_d+mY_{X/S}}\left[c_{S_0}-\frac{K_S(D+k_d)}{\mu_{max}-D-k_d}\right] \tag{8-110}$$

图 8-16 和图 8-17 分别说明了细胞死亡和维持代谢对恒化器操作特性的影响。当稀释率趋于零时，这两种因素都导致细胞浓度趋于零。并且可以看出，在同一 D 值时，随着 k_d 或 m 的增大，导致 c_X 下降。

细胞死亡还造成了临界稀释率 D_C 的减小：

$$D_C=\mu_{max}\frac{c_{S_0}}{K_S+c_{S_0}}-k_d \tag{8-111}$$

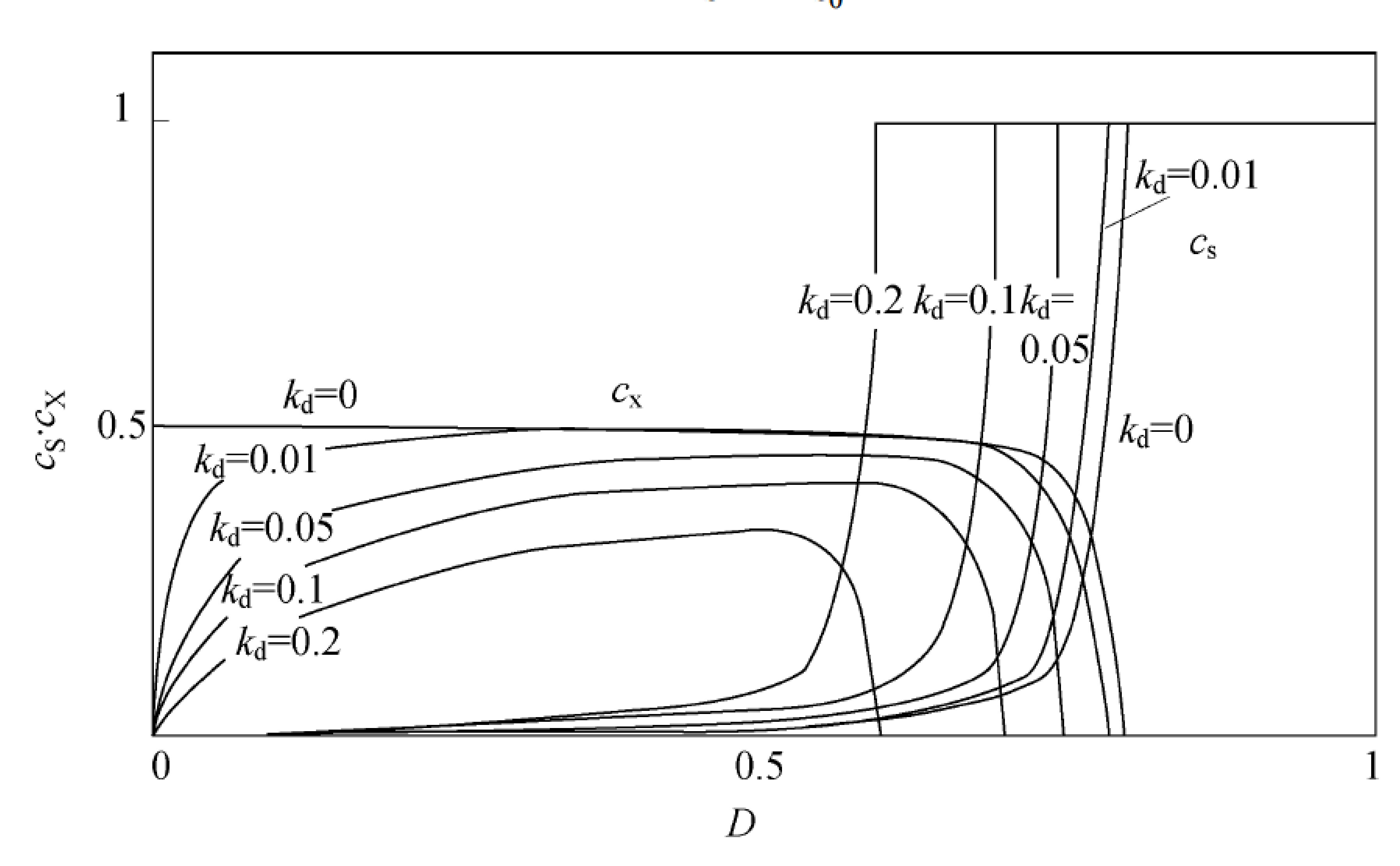


图 8-16　细胞死亡对恒化器操作特性的影响

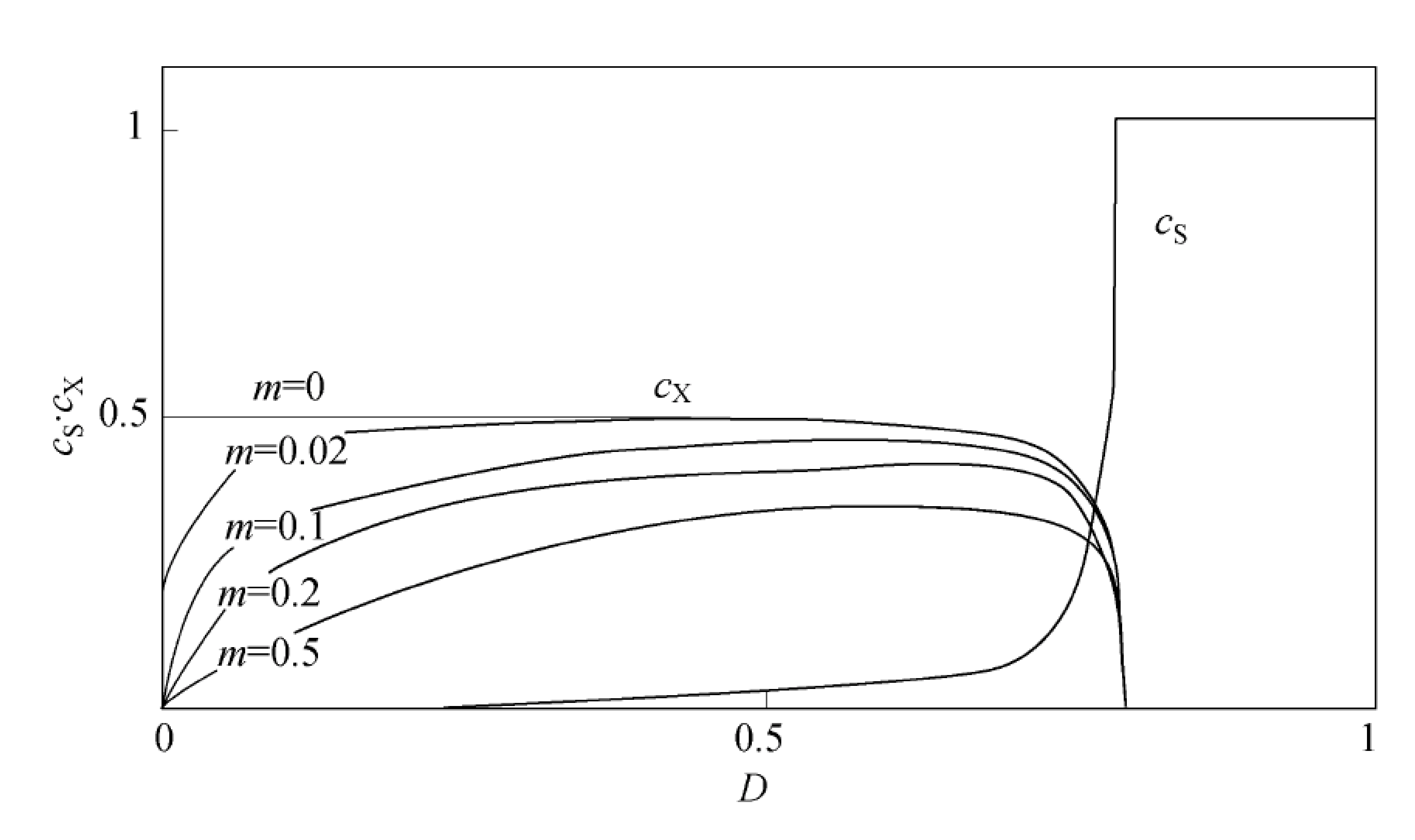


图 8-17　细胞维持代谢对恒化器操作特性的影响

（5）氧传递限制时的操作特性：在稳定态时，对细胞的质量衡算式为

$$D(c_X-c_{X_0})=\mu c_X \tag{8-112}$$

稳定态时氧传递速率与消耗速率相等，于是：

$$k_La(c_{OL}^*-c_{OL})=\frac{1}{Y_{X/O}}\mu c_X \tag{8-113}$$

并且：
$$\mu = \mu_{\max}\frac{c_{OL}}{K_{O_2} + c_{OL}} \tag{8-114}$$

当氧的限制较大时，应有 $c_{OL} \ll K_{O_2}$，$c_{OL} \approx 0$，由以上两式可得：

$$\mu c_X = \mu_{\max}\frac{c_{OL}}{K_{O_2}}c_X \approx k_L a c_{OL}^{*} Y_{X/O} \tag{8-115}$$

因此由式（8-115）可知，操作时细胞生长速率受到氧体积传质系数 $k_L a$ 和得率系数 $Y_{X/O}$ 的影响，由式（8-112）可见，这时稀释率下降。

如果氧传质系数 $k_L a c_{OL}^{*}$ 与 D 无关，对加料中无细胞的稳态操作，$c_{X_0} = 0$，式（8-112）可简化为

$$D = \mu \tag{8-116}$$

因此氧传递控制下恒化器的操作是稳定的。以恒化器作为实验手段，式（8-115）也可用于测定反应器的氧传质系数。

（6）固定化细胞培养时的操作特性：在单级 CSTR 中进行的固定化细胞催化反应，如图 8-18 所示。

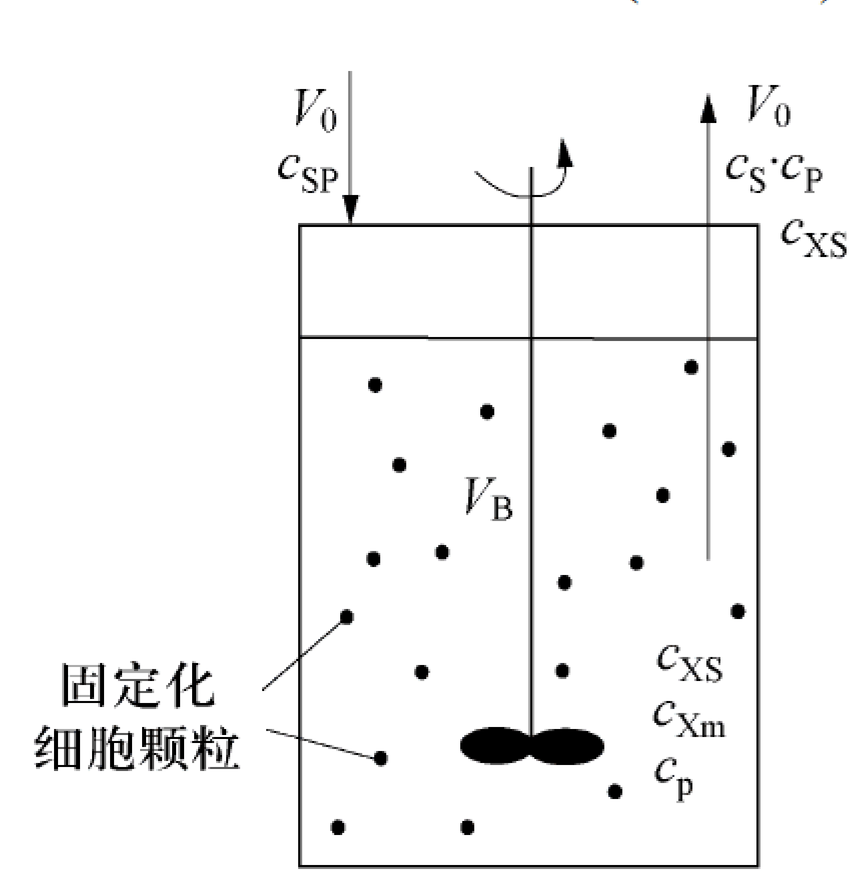


图 8-18　CSTR 中的固定化细胞培养

在该反应器内，含有细胞的球形颗粒保持悬浮和完全的混合，反应器中单位液相体积含有固定化细胞的浓度定义为 c_{Xim}，并假定 c_{Xim} 是一常数，这意味着所有固定化细胞颗粒全部保留在反应器内而不随产物流走，而且新产生细胞全部都释放到培养基中。培养基中游离细胞浓度为 c_{XS}。假设固定化细胞和游离细胞具有相同的本征生长比速率 μ，并假设忽略细胞的维持代谢和死亡，而且产物的合成仅与细胞生长直接相关。

做游离细胞的质量平衡，则应考虑该游离细胞是由游离细胞和固定化细胞两部分产生的，因此可以表示为

$$V_0 c_{XS} = V_R \mu c_{XS} + V_R \mu c_{Xim} \tag{8-117}$$

如果固定化细胞的生长速率受到扩散的影响，则式（8-117）中 μc_{Xim} 必须改写为 $\eta_T \mu c_{Xim}$。η_T 为表示扩散影响的总有效因子。

式（8-117）可表示为

$$D c_{XS} = \mu(c_{XS} + \eta_T c_{Xim}) \tag{8-118}$$

或：
$$D = \mu\left(1 + \frac{\eta_T c_{Xim}}{c_{XS}}\right) \tag{8-119}$$

从式（8-119）来看，当 $c_{Xim}=0$ 时，$D = \mu$。只要 $c_{Xim}>0$，则有 $D > \mu$。由此可见，对固定化细胞的 CSTR，D 可以在大于 μ 的条件下操作，这是它的一个优点。

若对底物做质量衡算，则可得到式（8-120），即：

$$D(c_{S_0} - c_S) = \frac{\mu}{Y_{X/S}}(c_{XS} + \eta_T c_{Xim}) \tag{8-120}$$

当 μ 用 Monod 方程表示时，可有：

$$\mu_{\max}\frac{c_S}{K_S + c_S} = \frac{D(c_{S_0} - c_S)Y_{X/S}}{(c_{S_0} - c_S)Y_{X/S} + \eta_T c_{Xim}} \tag{8-121}$$

将式（8-121）作图表示为图 8-19，从图中可以看出：

当 $c_{Xim} = 0$，此时 $D = \mu$，可求得如图所示的 D_C；

当 $c_{Xim}>0$，此时 $D>\mu$。

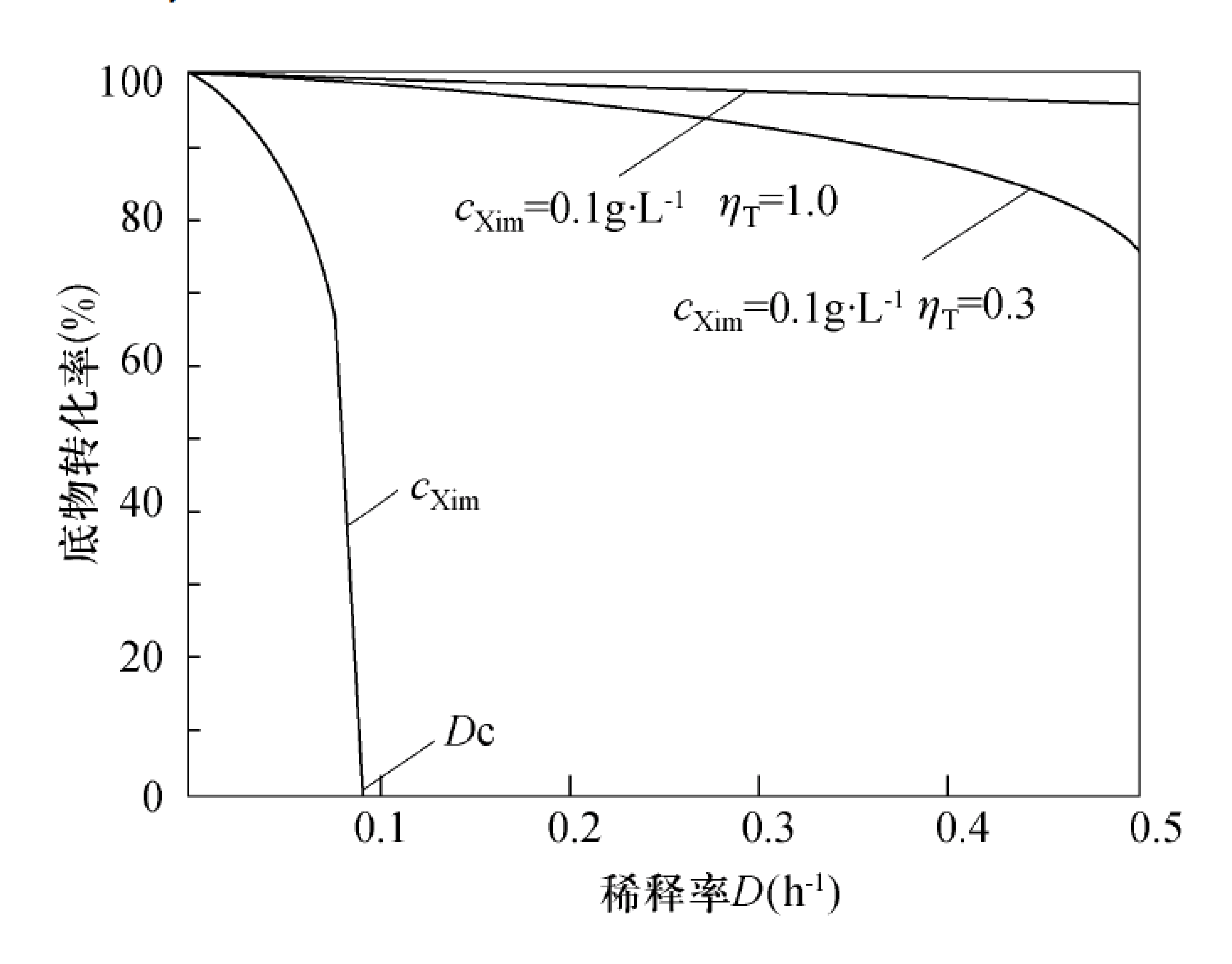


图 8-19 CSTR 有、无固定化细胞时底物转化率与稀释率的关系

在某一稀释率 D 时，有了固定化细胞，可以明显提高底物转化率，但是随着扩散限制作用的加大，反应速率明显在下降。

4. 酶反应时的 CPFR 接近于平推流的反应器是管式反应器，其主要优点是反应器生产能力较大，传热和传质效率较高，容易实现如程序控温、多点加料等优化控制。因此，管式反应器可用于特殊的生物工艺过程，例如酶和固定化反应、光合微生物培养和废水生物处理等过程。

对单底物，无抑制的 M－M 方程，代入式（8-57），积分可得：

$$r_{max}\tau_P=(c_{S_0}-c_S)+K_m\ln\frac{c_{S_0}}{c_S} \tag{8-122}$$

或：

$$r_{max}\tau_P=c_{S_0}X_S+K_m\ln\frac{1}{1-X_S} \tag{8-123}$$

从以上两式可见，该关系式与分批反应生物器的关系式类似，只需将 τ_P 替代 t_r 即可。

当底物有抑制时，可通过积分得到：

$$r_{max}\tau_P=c_{S_0}X_S+K_m\ln\frac{1}{1-X_S}+\frac{c_{S_0}^2}{2K_{SI}}(2X_S-X_S^2) \tag{8-124}$$

当为竞争性产物抑制时：

$$r_{max}\tau_P=c_{S_0}X_S\left(1-\frac{K_m}{K_P}\right)+K_m\left(1+\frac{c_{S_0}}{K_P}\right)\ln\frac{1}{1-X_S} \tag{8-125}$$

当为非竞争性产物抑制时：

$$r_{max}\tau_P=c_{S_0}X_S\left(1+\frac{c_{S_0}}{K_P}-\frac{K_m}{K_P}\right)-c_{S_0}^2\frac{2X_S-X_S^2}{2K_P}+K_m\left(1+\frac{c_{S_0}}{K_P}\right)\ln\frac{1}{1-X_S} \tag{8-126}$$

若为固定化酶反应，定义 $\tau_P=\frac{V_R}{V_0}$，ε_L 为反应器中液相占有体积分数，则其关系式为：

$$\tau_P=-\frac{1}{1-\varepsilon_L}\int_{c_{S_0}}^{c_S}\frac{dc_S}{\eta r_S} \tag{8-127}$$

如果为动力学控制，$\eta=1$，反应符合 M－M 方程，则式（8-127）可积分为

$$r_{max}(1-\varepsilon_L)\tau_P = c_{S_0}X_S + K_m\ln\frac{1}{1-X_S} \tag{8-128}$$

如果 $c_{S_0} \leqslant K_m$，反应可按一级不可逆反应处理，若固定化酶颗粒为球形，则式（8-123）可积分为

$$r_{max}(1-\varepsilon_L)\tau_P = \frac{K_m\ln\frac{1}{1-X_S}}{\frac{1}{\varphi}\left[\frac{1}{\tanh(3\varphi)}-\frac{1}{3\varphi}\right]} \tag{8-129}$$

若固定化酶颗粒为片状，则有式（8-130），即：

$$r_{max}(1-\varepsilon_L)\tau_P = \frac{K_m\ln\frac{1}{1-X_S}}{\frac{\tanh(\varphi)}{\varphi}} \tag{8-130}$$

式中：φ 为梯勒模数。

8.3.3　细胞回流连续过程

1. 带细胞循环的单级 CSTR　将 CSTR 流出的培养液进行分离，经浓缩的细胞悬浮液被送回 CSTR 中，就成为带有细胞循环的 CSTR 操作，其示意图如图 8-20 所示。细胞的循环相当于不断给反应器接种，不但提高了生物反应器中细胞的浓度，也有利于提高反应器操作的稳定性，从而使 CSTR 生产率明显增加，过程扰动的影响降至最低。

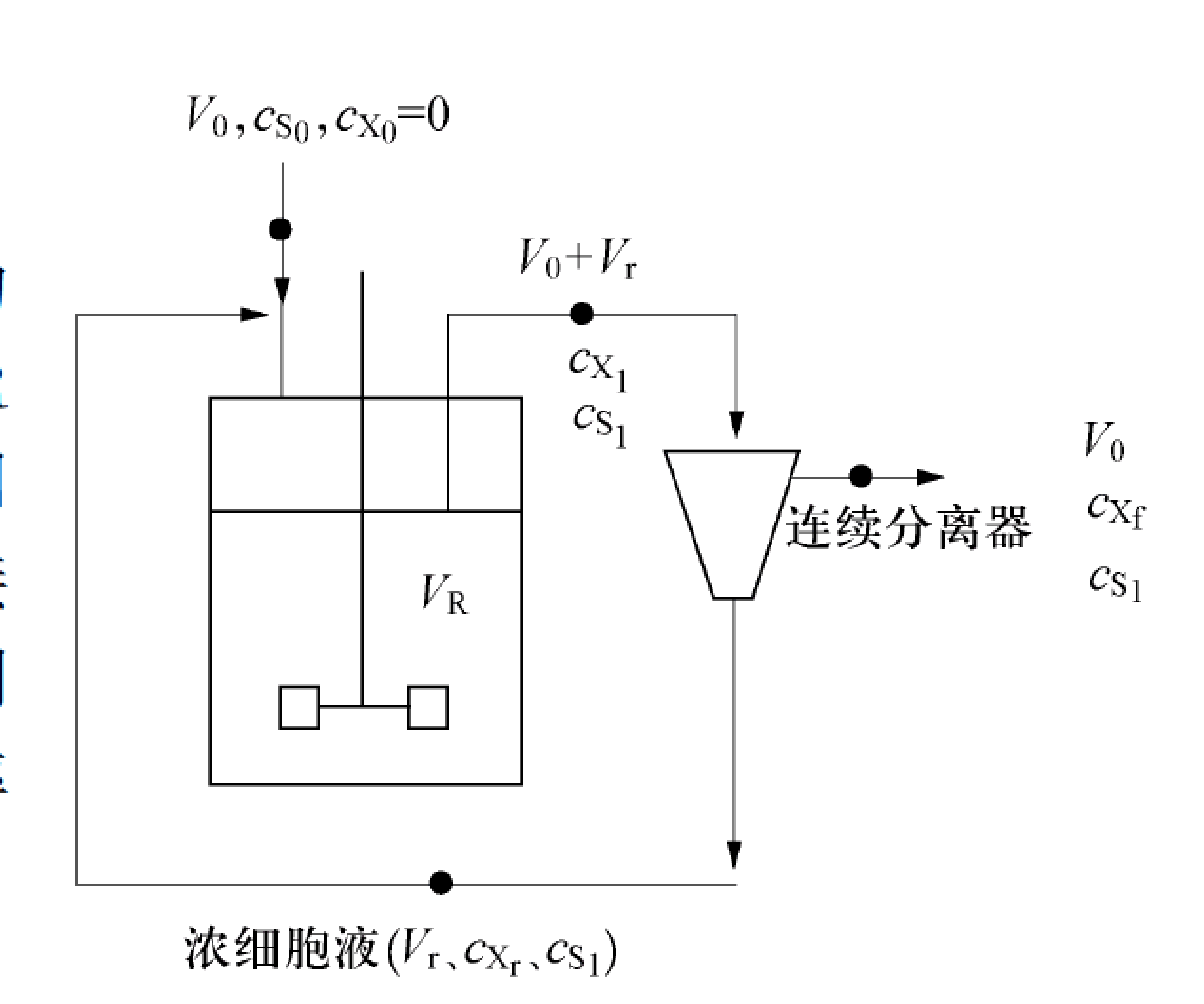


图 8-20　带细胞循环的单级 CSTR 示意图

若定义

物料循环比（体积比）为

$$R = \frac{V_r}{V_0} \tag{8-131}$$

式中：R 为物料循环比。

细胞浓缩系数为

$$\beta = \frac{c_{X_r}}{c_{X_1}} \tag{8-132}$$

式中：β 为细胞浓缩常数。

根据带循环 CSTR 的特性，应有 $R>0$，$\beta>1$。在稳态条件下，对 CSTR 做细胞的衡算，如式（8-133），即：

输入量 + 循环量 + 生长量 = 输出量

$$V_0c_{X_0} + V_rc_{X_r} + V_Rr_X = (V_0+V_r)c_{X_1} \tag{8-133}$$

因为 $c_{X_0}=0$，$V_R = RV_0$，$r_X = \mu c_X$，$D = \frac{V_0}{V_R}$，则式（8-133）可整理为

$$D = \frac{\mu}{1+R-R\beta} = \frac{\mu}{W} \tag{8-134}$$

或：

$$\mu = D(1+R-R\beta) \tag{8-135}$$

由式（8-135）可以看出，在有细胞循环时，CSTR 中的细胞在稳态下的生长比速率与其稀释率不再相等，而且由于浓缩系数 $\beta>1$，因此 $1+R-R\beta$ 恒小于 1，故稀释率恒大于生长比速率。

对底物 S 做衡算：

输入 + 循环 = 消耗 + 输出

$$V_0c_{S_0}+RV_0c_{S_1}=V_Rr_S+V_0(1+R)c_{S_1} \tag{8-136}$$

经整理得到：

$$D(c_{S_0}-c_{S_1})=\frac{1}{Y_{X/S}}\mu c_{X_1} \tag{8-137}$$

所以：

$$c_{X_1}=\frac{Y_{X/S}}{W}(c_{S_0}-c_{S_1}) \tag{8-138}$$

因此反应器中细胞浓度为无循环时的 $1/W$ 倍。同样可推得：

$$c_{S_1}=\frac{K_SWD}{\mu_{max}-WD} \tag{8-139}$$

与无循环相比，由于循环的作用，使得反应器出口底物浓度 c_{S_1} 进一步降低，底物的转化率提高，同时 c_{X_1} 值提高，也有利于提高细胞的生产率。

对带循环的 CSTR，其临界稀释率可表示为

$$D_{C_r}=\frac{1}{W}\times\frac{\mu_{max}c_{S_0}}{K_S+c_{S_0}} \tag{8-140}$$

故

$$D_{C_r}=\frac{1}{W}D_C \tag{8-141}$$

$$D_{C_r}>D_C \tag{8-142}$$

由于循环作用，使其临界稀释率提高，允许的加料速率亦可提高。如果加料速率不变，则所需反应器体积可减小。

上述各式中，V_0、c_{S_0}为反应器新加入底物的体积流量和浓度；c_{S_1}、c_{X_1}为反应器出口处（亦为反应器内）底物和细胞浓度；V_r、c_{X_r}为循环物料的体积流量和其细胞浓度；D_C、D_{C_r}分别为无循环和有循环时的临界稀释率。图 8-21 表示了细胞循环与不循环时，细胞浓度和细胞产率随 D 变化的比较。

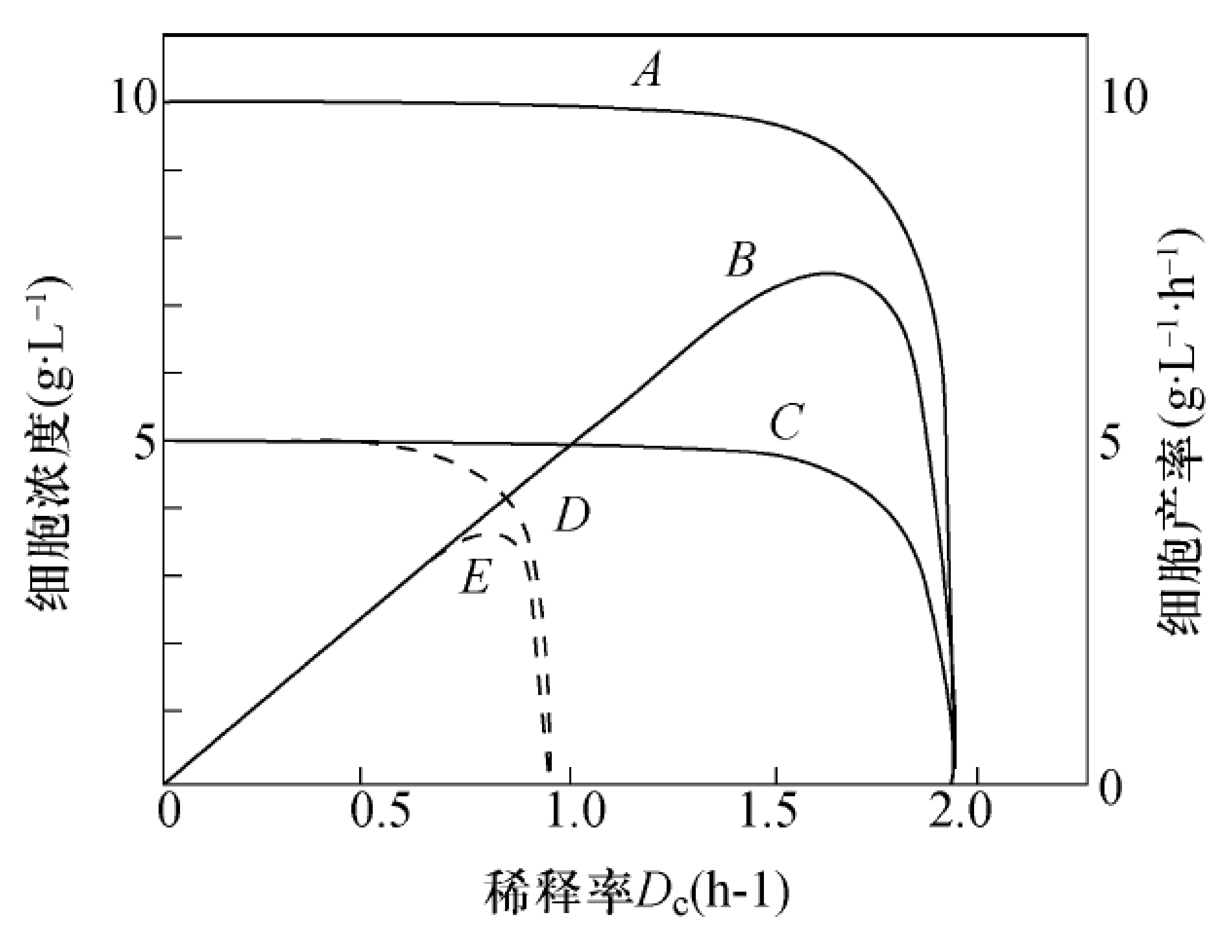


图 8-21　细胞循环与不循环的比较

A、*B*、*C* 表示循环；*D*、*E* 表示不循环；*A*、*D* 表示反应器中细胞浓度；*B*、*E* 表示细胞产率；*C* 表示出口细胞浓度

从图 8-21 可以看出，对细胞进行提浓循环，明显可以提高细胞在 CSTR 中的浓度和 Dc_X 值。当然，如果对细胞不提浓而仅仅循环，则此种循环将无意义。

图 8-22 所示为循环细胞浓度对 CSTR 性能的影响。从图中可以看出，提高浓缩系数，增大循环细胞浓度，有利于提高底物的利用率，也有利于增加反应器对加料速率变化的稳定性。

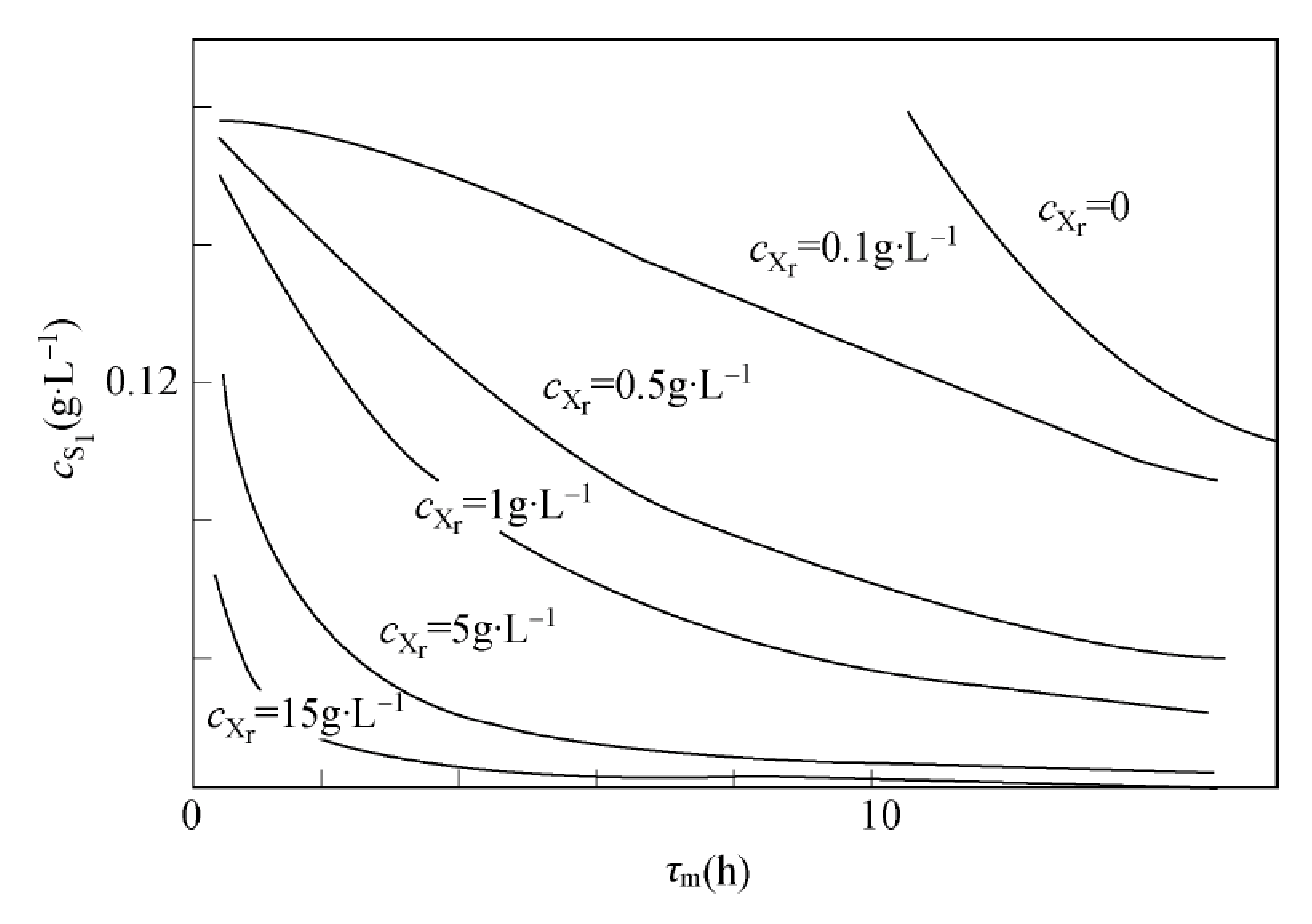


图 8-22　循环细胞浓度对 CSTR 性能的影响

2. 带细胞循环的 CPFR　对在 CPFR 中进行细胞反应过程，由于 CPFR 的返混为零，操作时必须不断地接种，反应才能正常进行，否则细胞将随培养基洗出，细胞反应不能正常进行。带循环的 CPFR 使部分细胞从出口加入反应器进口，可以使 CPFR 中始终保持细胞存在，因此可在没有细胞提浓装置时，达到对细胞自身催化特性的充分利用。带循环的 CPFR 的设计关键是选择最优物料循环速度，以达到使反应器体积最小的目的。以下首先分析细胞培养时此反应器的操作特性。图 8-23 为带循环的 CPFR 物料关系。

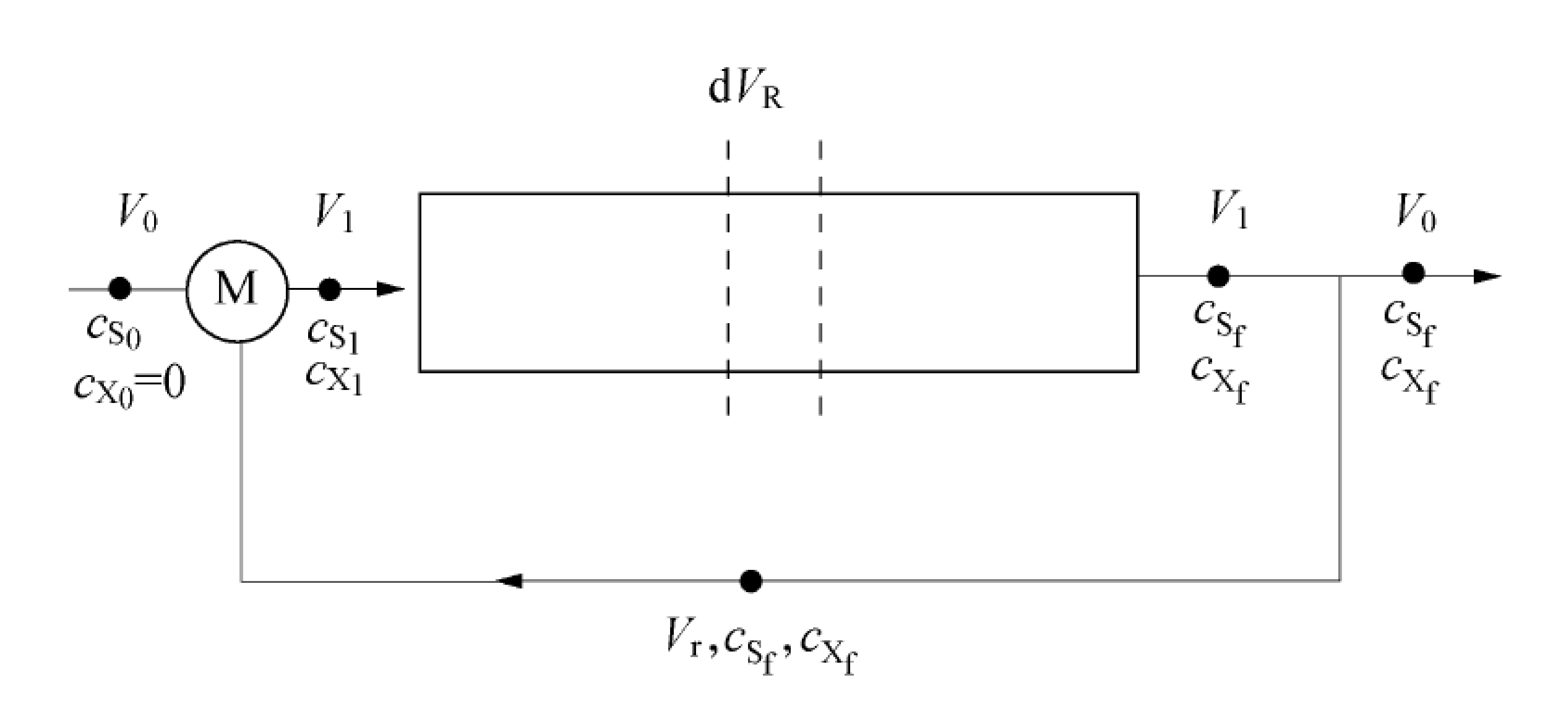


图 8-23　带循环的 CPFR 物料关系

对 CPFR，当无循环时，其设计式为

$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = \int_{c_{S_f}}^{c_{S_0}} \frac{\mathrm{d}c_S}{r_S} = \int_{c_{S_f}}^{c_{S_0}} \frac{Y_{X/S}(K_S + c_S)}{\mu_{max} c_S c_X} \mathrm{d}c_S \tag{8-143}$$

当有循环时，循环物料通过循环管路回到反应器入口，反应器内流体流动仍为平推流，因此上述设计关系式（8-143）仍可使用，仅需改变式（8-143）中反应器入口的体积流量和有关数值。

定义循环比 $R = \dfrac{V_r}{V_0}$，则反应器入口处物料处理量为

$$V_1 = V_0 + V_r = V_0(1 + R) \tag{8-144}$$

反应器入口处浓度可通过做 M 点物料平衡求出：

$$V_0 c_{S_0} + RV_0 c_{S_f} = V_1 c_{S_1} = V_0(1+R)c_{S_1} \tag{8-145}$$

故：
$$c_{S_1} = \frac{c_{S_0} + Rc_{S_f}}{1+R} \tag{8-146}$$

和：
$$X_{S_1} = \frac{X_{S_0} + Rc_{S_f}}{1+R} \tag{8-147}$$

当 $X_{S_0}=0$ 时：
$$X_{S_1} = \frac{R}{1+R} X_{S_f} \tag{8-148}$$

将上述结果代入式（8-57）中，得到：

$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = (1+R)\int_{c_{S_f}}^{\frac{c_{S_0}+Rc_{S_f}}{1+R}} \frac{dc_S}{r_S} \tag{8-149}$$

和：
$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = c_{S_0}(1+R)\int_{\frac{R}{1+R}X_{S_f}}^{X_{S_f}} \frac{dX_S}{r_S} \tag{8-150}$$

根据：
$$r_S = \frac{1}{Y_{X/S}} r_X = \frac{1}{Y_{X/S}} \times \frac{\mu_{max} c_S}{K_S + c_S} c_X \tag{8-151}$$

$$c_X = c_{X_0} + Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S) \tag{8-152}$$

若 $c_{X_0} = 0$，则可对式（8-150）积分，并求得：

$$\mu_{max}\tau_P = (1+R)\left[\frac{K_S}{c_{S_0}}\ln\frac{c_{S_0}+Rc_{S_f}}{Rc_{S_f}} + \ln\frac{1+R}{R}\right] \tag{8-153}$$

式（8-153）为 $c_{X_0} = 0$ 时的总循环方程式。根据此方程，τ_P 、R、c_{S_f} 三个变量中只要已知其中两个，就可确定第 3 个。

对带循环的 CPFR，存在最佳循环比，条件为

$$\frac{dc_X}{dR} = 0 \tag{8-154}$$

得到：
$$\frac{K_S}{c_{S_0}}\ln\frac{c_{S_0}+Rc_{S_f}}{Rc_{S_f}} + \ln\frac{1+R}{R} = \frac{1+R}{R} \times \frac{K_S}{c_{S_0}+Rc_{S_f}} + \frac{1}{R} \tag{8-155}$$

可见，最佳 R 值为 K_S/c_{S_0} 和 c_S/c_{S_0} 的函数。用试差法求解式（8-155），可表示为图 8-24。从图中可以看出，随 K_S/c_{S_0} 的减小和 c_S/c_{S_0} 的增大，最佳循环比 R_{opt} 相应增大。

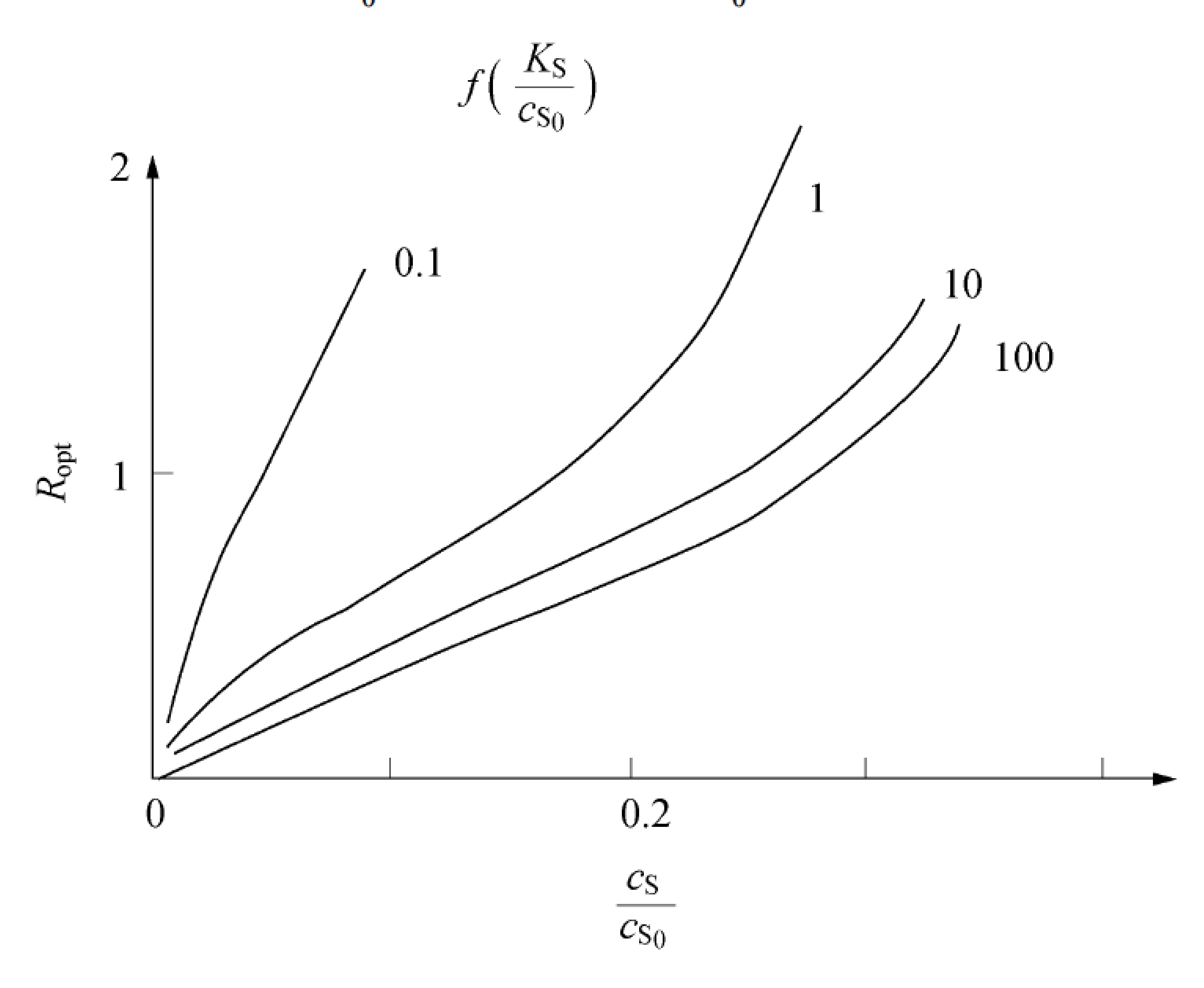


图 8-24　最佳循环比与 K_S/c_{S_0} 和 c_S/c_{S_0} 的关系

对一般酶反应过程，循环式 CPFR 的优化设计目的是，对规定的底物转化率 X_S，选择某一最佳循环比以使所需反应器体积最小。可采用图解法进行计算，如图 8-25 所示。

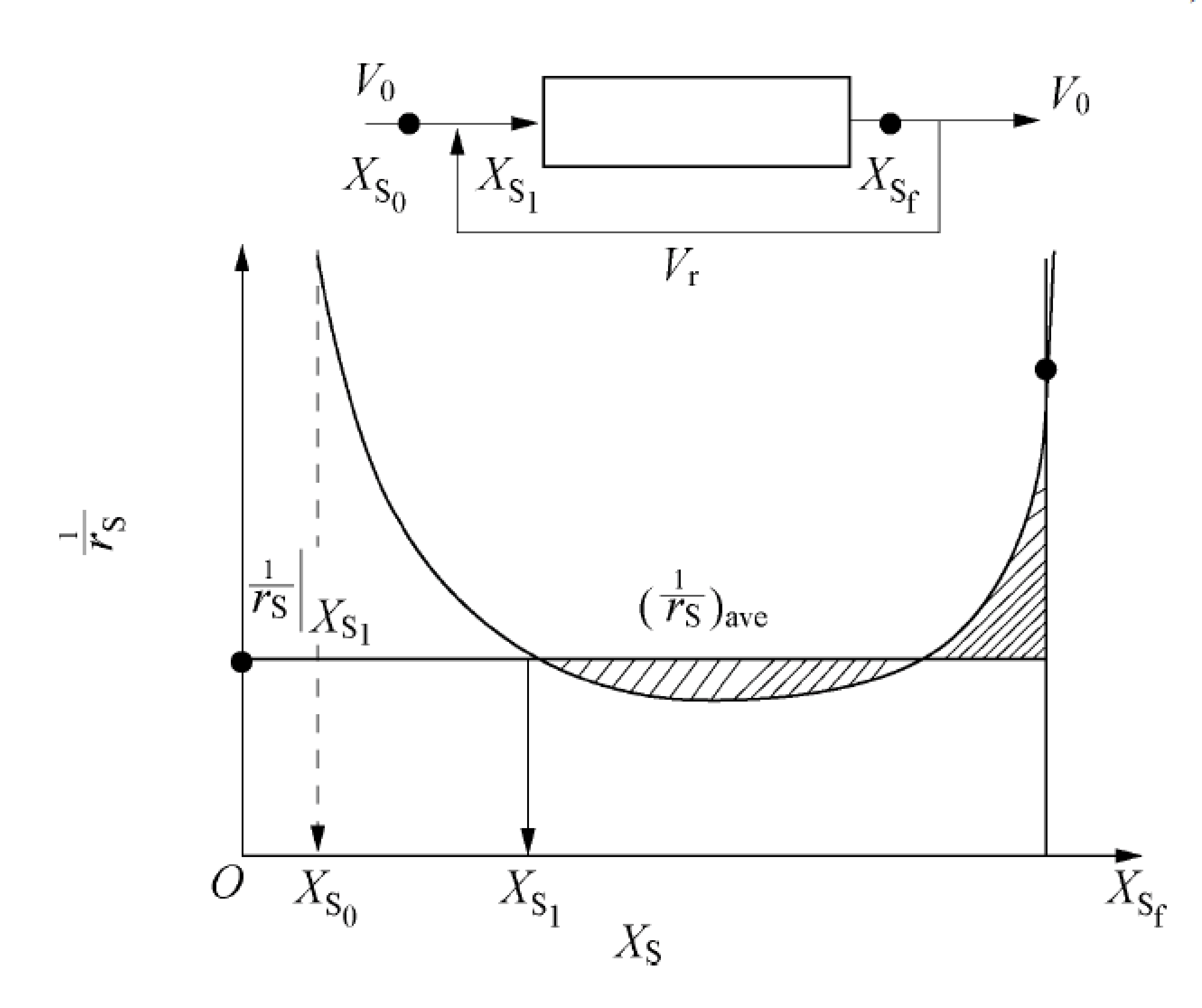


图 8-25　最佳循环比的确定

确定最佳循环比的原则是使反应器入口处物料反应速率的倒数等于物料在反应器内速率倒数的平均值，即图 8-25 中两块阴影面积相等。以数学形式表示为

$$\frac{1}{r_S}\Big|_{X_{S_1}} = \frac{\int_{X_{S_1}}^{X_{S_f}} \frac{dX_S}{r_S}}{X_{S_f} - X_{S_1}} \tag{8-156}$$

对在 CSTR 中进行细胞反应，若采用循环已浓缩过的细胞来操作，会使 CPFR 的操作性能进一步改善，即临界稀释率 D_C 增大，如图 8-26 所示。从图中可以看出，当循环比 R 和细胞浓缩系数 β 增加，其临界稀释率 D_C 亦在提高。

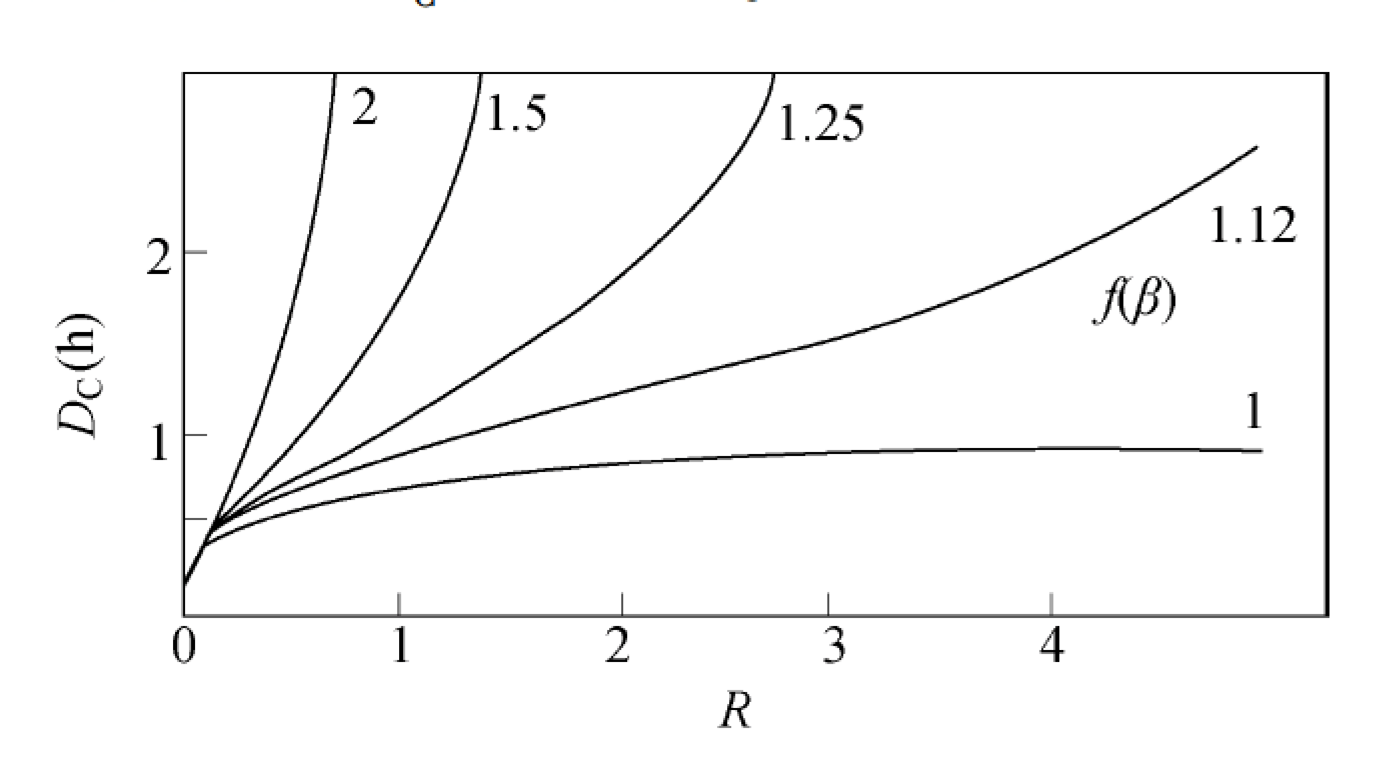


图 8-26　带循环的 CPFR 中循环比和细胞浓度对 D_C 的影响

对采用固定化细胞为催化剂的反应过程，其反应器类型有固定床、流化床和气升式等。图 8-27 所示为固定化床和流化床固定化细胞反应器。

对某些反应体系，如固定化细胞体系要求很高的物料循环比以维持反应器内混合均匀所需条件，则其操作模型接近于 CSTR；而对另外一些体系，要求其不循环或循环量很少，则可处理为 CPFR 模型。如果按 CPFR 模型处理，对某一底物的衡算式为

$$-F dc_S = N_S aA dZ \tag{8-157}$$

式中：c_S 为液相中的底物质量浓度，并且是床层高度的函数（$mg \cdot cm^{-3}$）；F 为液体培养基流量（$cm^3 \cdot h^{-1}$）；N_S 为底物进入生物膜的量（$mg \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$）；$a$ 为单位反应器体积具

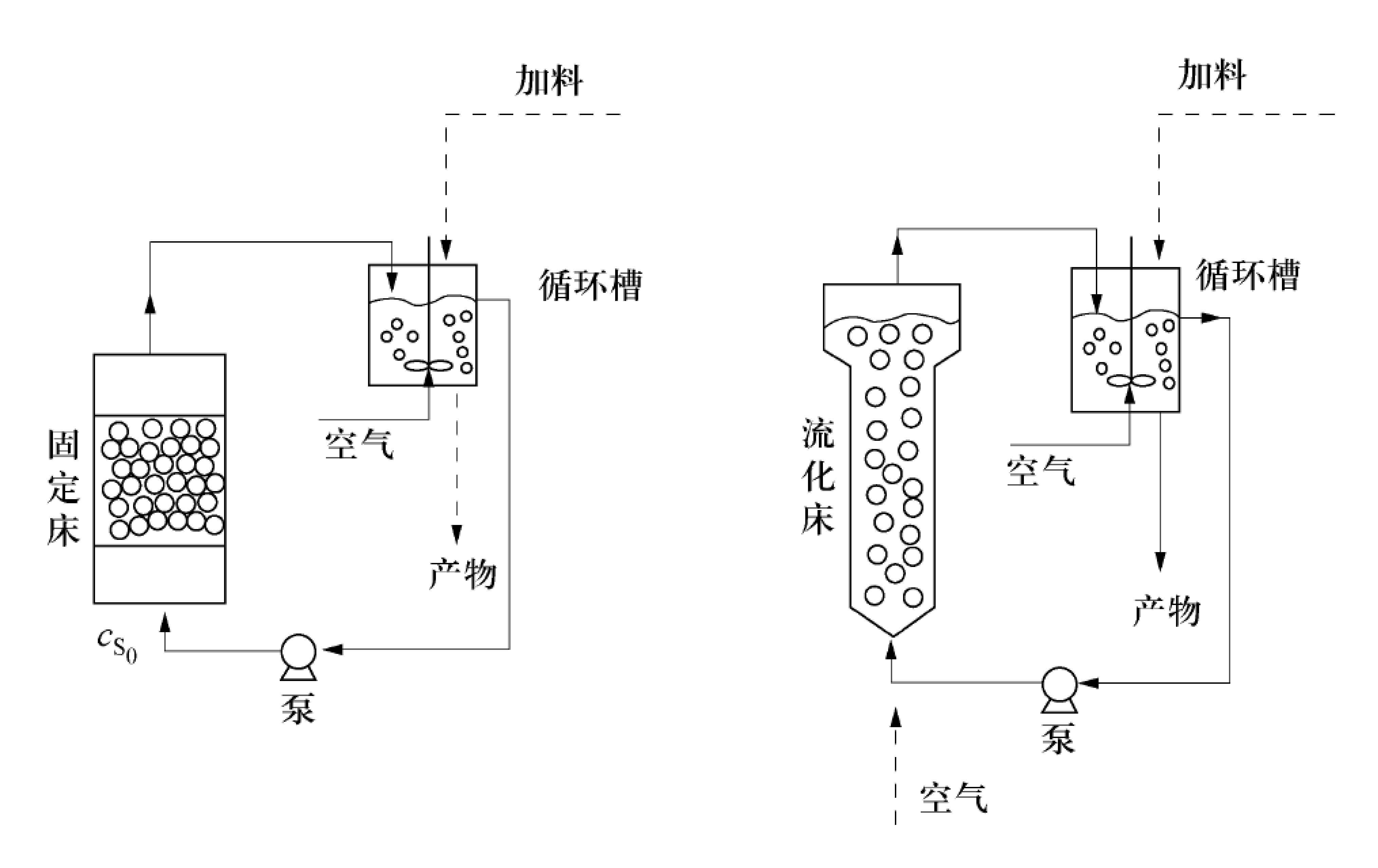


图 8-27 具有固定化细胞的固定床和流化床反应器

有的生物膜或载体颗粒表面积（$cm^2 \cdot cm^{-3}$）；A 为床层横截面积（cm^2）；dZ 为床层微分单元高度（cm）。

因为：

$$N_S = -D_e \frac{dc_S}{dy}\Big|_{y=L} = \eta\left(\frac{r_{max} c_S}{K_S + c_S}\right) L \tag{8-158}$$

所以：

$$-F\frac{dc_S}{dZ} = \eta \frac{r_{max} c_S}{K_S + c_S} LaA \tag{8-159}$$

$$K_S \ln \frac{c_{S_0}}{c_S} + (c_{S_0} - c_S) = \frac{\eta r_{max} LaA}{F} H \tag{8-160}$$

式中：c_{S_0}为进口处液相底物质量浓度（$g \cdot L^{-1}$）；L 为生物膜或载体颗粒特征长度（$L = V_P / A_P$，cm）；H 为床层总高度（cm）。

如果进料中底物浓度太低，则底物消耗速率为一级动力学，则可得到式（8-161），即：

$$\ln \frac{c_S}{c_{S_0}} = -\frac{\eta r_{max} LaA}{FK_S} H \tag{8-161}$$

此时底物浓度沿床层高度呈指数下降。上述方程可用于设计固定化细胞反应器，以决定达到某一底物转化水平所需要的床层高度。

8.3.4 连续反应过程的优化

进行连续操作反应器优化设计的主要问题是如何根据不同反应动力学特点，选择具有特定返混浓度分布特征的反应器型号，以使反应器体积最小。下面将进一步讨论如何根据酶和细胞反应动力学的特点，对 CSTR、CPFR 及其它们的组合形式进行优化设计。

1. 酶反应过程 首先以单底物、无抑制的均相酶反应动力学为例对 CSTR 和 CPFR 作比较与选择。

根据前已得出的基本关系式（8-58）和式（8-123），对同一反应体系，在相同的反应条件下达到相同的转化率时，CSTR 和 CPFR 两者所需反应器体积之比为

$$\frac{V_{R,CSTR}}{V_{R,CPFR}} = \frac{X_S + \frac{K_m}{c_{S_0}}\left(\frac{X_S}{1 - X_S}\right)}{X_S + \frac{K_m}{c_{S_0}}\ln\left(\frac{1}{1 - X_S}\right)} \tag{8-162}$$

以 K_m/c_{S_0} 为参数，以 $\frac{V_{R,CSTR}}{V_{R,CPFR}} - X_S$ 对应作图，得到如图 8-28 所示的结果。从图中可以看出，对 M－M 方程可得出下述结果。

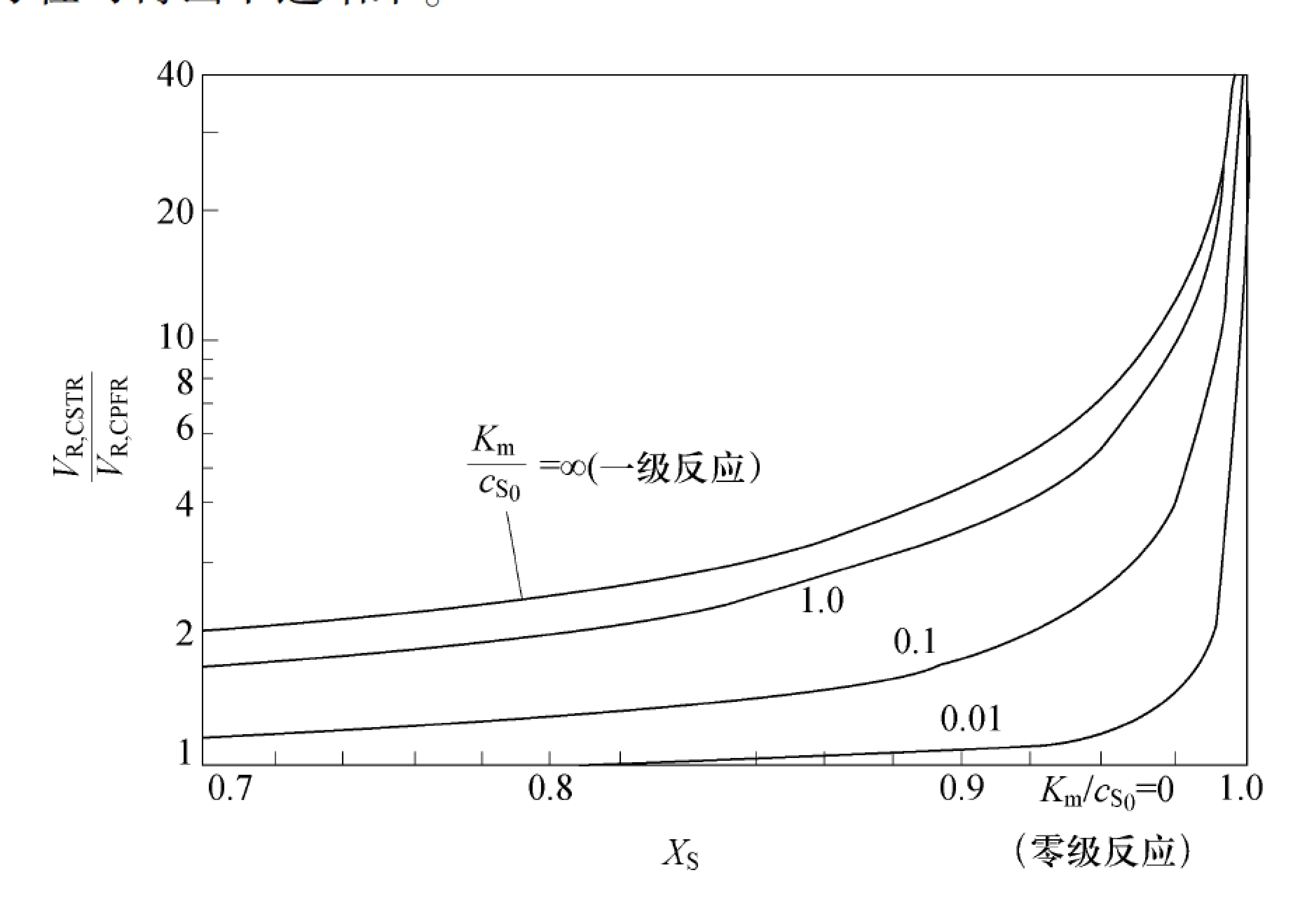


图 8-28　V_0 一定时 CSTR 与 CPFR 为达到相同转化率 X_S 所需酶总量之比与 X_S 的关系

（1）达到同一转化率时，CSTR 所需体积要比 CPFR 所需体积大，或需要更多的酶。并且转化率愈高，两者比值愈大。这表明，转化率愈高，返混的影响程度愈大。

（2）随着 K_m/c_{S_0} 值从零增大，反应速率与底物浓度的关系由零升级为一级，两种反应器的体积比随之增大。这表明，随着反应级数提高，返混的影响亦在增大。

对底物抑制的酶反应，由于在 CPFR 中维持了比 CSTR 中更高的底物浓度，因而在 CPFR 中底物的抑制作用更强烈，此时显然采用 CSTR 更为有利。若使反应器体积最小，可以采用一个 CSTR 与一个 CPFR 的串联设计方案，底物在 CSTR 中的浓度可保持在反应速度最大时的浓度，也可采用循环式 CPFR 的设计。

对产物抑制酶反应，由于在 CSTR 中维持了比 CPFR 中较高的产物浓度，因而在 CSTR 中产物的抑制作用较大，此时显然采用 CPFR 更为有利。

2. 细胞反应过程　对有些 CSTR 的细胞连续培养，过程优化的目标函数为单位时间单位体积的细胞产量 P_X 最大，P_X 一般称为细胞产率。

$$P_X = Dc_X = DY_{X/S}(c_{S_0} - c_S) \tag{8-163}$$

或：

$$P_X = DY_{X/S}\left(c_{S_0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right) \tag{8-164}$$

可见 P_X 受到稀释率的影响。如图 8-11 所示，P_X 有一极大值。令：

$$\frac{dP_X}{dD} = 0 \tag{8-165}$$

可求得当 P_X 为最大时的稀释率 D_{opt}，即：

$$D_{opt} = \mu_{max}\left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + c_{S_0}}}\right) \tag{8-166}$$

此时反应器中细胞质量浓度为

$$c_{X,opt} = Y_{X/S}\left[c_{S_0} + K_S - \sqrt{K_S(K_S + c_{S_0})}\right] \tag{8-167}$$

所以：

$$(P_X)_{max} = D_{opt}c_{X,opt} = Y_{X/S}\mu_{max}c_{S_0}\left(\sqrt{\frac{K_S + c_{S_0}}{c_{S_0}}} - \sqrt{\frac{K_S}{c_{S_0}}}\right)^2 \tag{8-168}$$

从图 8-11 中可以看出，当 D 值在一定范围内增加时，P_X 随之增大。当 D 继续增大时，P_X 反而下降。因此存在一最佳稀释率 D_{opt}，相应的细胞产率 P_X 达到最大值。

如果 $c_{S_0} \gg K_S$，上述有关关系式可以简化为

$$D_{opt} \approx D_C \approx \mu_{max} \tag{8-169}$$

$$c_{X,opt} = Y_{X/S}c_{S_0} \tag{8-170}$$

$$(P_X)_{max} \approx D_C Y_{X/S}c_{S_0} \tag{8-171}$$

Levenspiel 定义一参数 N，表示为

$$N = \sqrt{1 + \frac{c_{S_0}}{K_S}} \tag{8-172}$$

对 Monod 动力学，可得到：

$$D_{opt} = \mu_{max}\frac{N - 1}{N} \tag{8-173}$$

$$c_{X,opt} = Y_{X/S}c_{S_0}\frac{N}{N + 1} \tag{8-174}$$

$$(P_X)_{max} = \mu_{max}Y_{X/S}c_{S_0}\frac{N - 1}{N + 1} \tag{8-175}$$

当底物消耗速率最大时的底物浓度为

$$c_{S,opt} = c_{S_0}\frac{1}{N + 1} \tag{8-176}$$

依据上述对恒化器的基本分析，可以对 CSTR 中的细胞连续培养进行优化设计和操作。

下面将以最基本的单底物无抑制的 Monod 动力学为例来讨论以所需反应器体积最小作为优化目标时的反应器的优化设计问题。

$$r_X = \mu c_X = \mu_{max}\frac{c_S}{K_S + c_S}c_X \tag{8-177}$$

$$r_S = \frac{1}{Y_{X/S}}\mu c_X = \frac{1}{Y_{X/S}}\mu_{max}\frac{c_S}{K_S + c_S}c_X \tag{8-178}$$

根据：

$$Y_{X/S} = \frac{c_X - c_{X_0}}{c_{S_0} - c_S} \tag{8-179}$$

则有：

$$c_S = c_{S_0} - \frac{1}{Y_{X/S}}c_X + \frac{1}{Y_{X/S}}c_{X_0} \tag{8-180}$$

$$c_X = c_{X_0} + Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S) \tag{8-181}$$

当 $c_{X_0} = 0$，将式（8-180）和式（8-181）代入式（8-177）和式（8-178）中，可得到：

$$r_X = \frac{\mu_{max}\left(c_{S_0} - \frac{1}{Y_{X/S}}c_X\right)}{K_S + c_{S_0} - \frac{1}{Y_{X/S}}c_X}c_X \tag{8-182}$$

$$r_S = \frac{\mu_{max}c_S}{K_S + c_S}(c_{S_0} - c_S) \tag{8-183}$$

根据式（8-182），当 c_X 值较小时，提高 c_X 值，r_X 增大；当 c_X 值较高时，提高 c_X 值，r_X 减小，因此 $r_X - c_X$ 为一有最大值的曲线关系。同样根据式（8-183），$r_S - c_S$ 的关系亦为一有最大值的曲线。

若以 $\frac{1}{r_X} - c_X$ 为例，对此关系可作图 8-29。曲线的最低点为速率最大值，相对应的横轴点为生长速率最大时的细胞浓度 $c_{X,opt}$。根据图 8-29，以下定性比较 CSTR 与 CPFR 的特性。

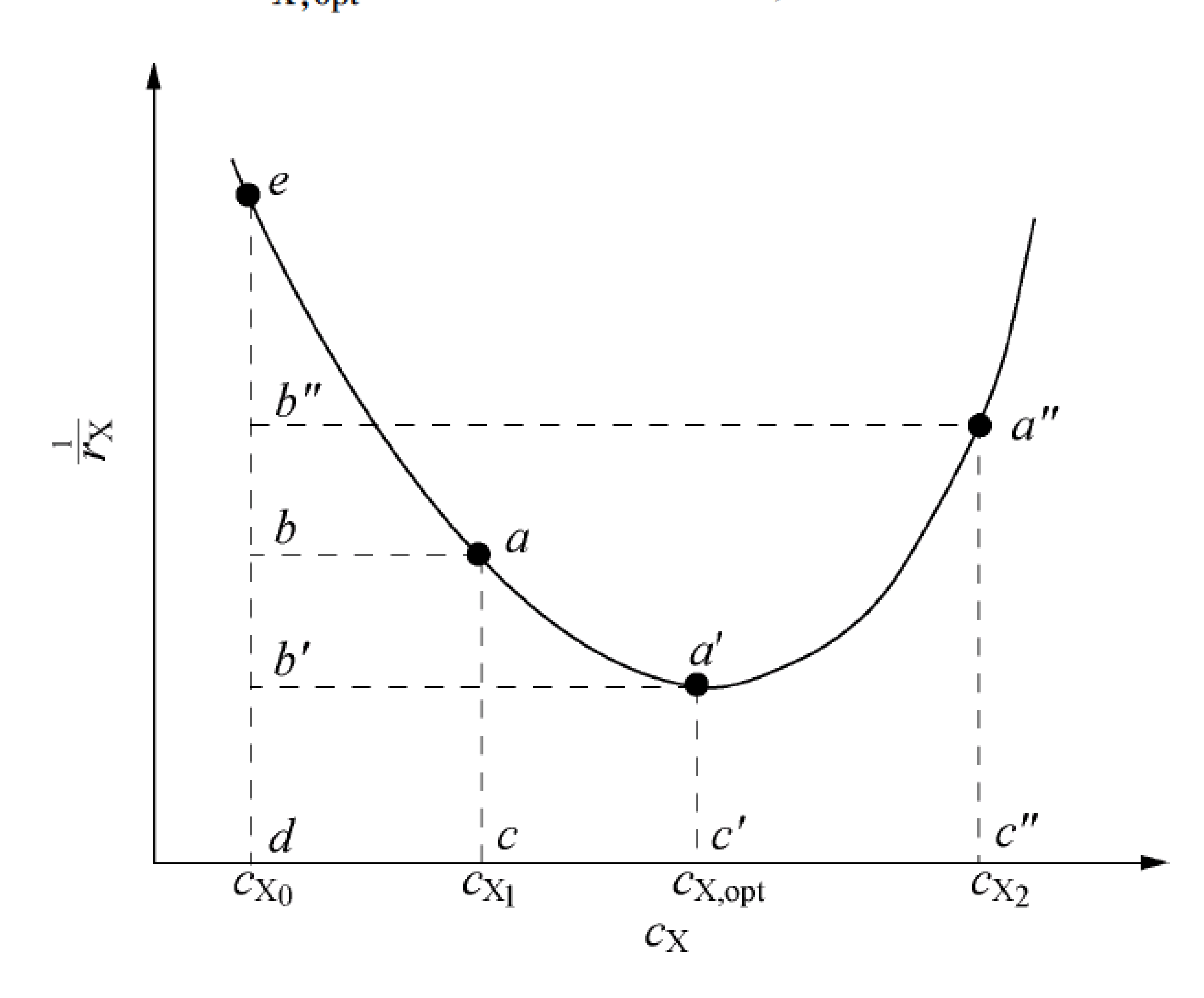


图 8-29　图解法确定反应器体积

对单级 CSTR，其设计关系式可表示为

$$\tau_m = \frac{V_R}{V_0} = \frac{c_{S_0} - c_S}{r_S} = \frac{c_X - c_{X_0}}{r_X} \tag{8-184}$$

在图 8-29 中可以看出，当 $c_X = c_{X_1}$ 时，图中矩形面积 *abdc* 即为其 τ_m 值；当 $c_X = c_{X_2}$ 时，图中矩形面积 *a″b″dc″* 的面积即为其 τ_m 值；当 $c_X = c_{X,opt}$ 时，图中矩形面积 *a′b′dc′* 的面积即为其 τ_m 值。显然，若反应器内细胞浓度能控制在 $c_{X,opt}$ 下操作，则相应的 CSTR 反应器体积为最小。

对 CPFR 的设计关系式可表示为

$$\tau_P = \frac{V_R}{V_0} = \int_{c_{X_0}}^{c_X} \frac{dc_X}{r_X} \tag{8-185}$$

当 $c_X = c_{X_1}$ 时，图 8-29 中 *aedc* 所包围的面积即为所求 τ_P 值；当 $c_X = c_{X_2}$ 时，*a″edc″* 所包围的面积即为所求 τ_P 值；当 $c_X = c_{X,opt}$ 时，*a′edc′* 所包围的面积即为所求 τ_P 值。

从其面积大小可定性地看出：当 $c_X \ll c_{X,opt}$ 时，$\tau_P > \tau_m$；当 $c_X > c_{X,opt}$ 时，很有可能出现 $\tau_P < \tau_m$。

根据上述分析，对细胞反应的最基本动力学，若以所需反应器体积最小作为优化目标来考虑，当 $c_X \leqslant c_{X,opt}$ 时，采用 CSTR 有利，当 $c_X > c_{X,opt}$ 时，采用 CSTR 与 CPFR 相串联可使所

需总反应器体积为最小，如图 8-30 所示。

根据图 8-30，可采用 CSTR 在前、CPFR 在后相互串联的反应器组合方式。CSTR 维持在最大速率下操作，反应器内细胞浓度为 $c_{X,\,opt}$，同时为 CPFR 连续稳定地提供细胞。从使所需反应器体积为最小的目标来说，对细胞反应，此种组合方式为最佳组合方案之一。

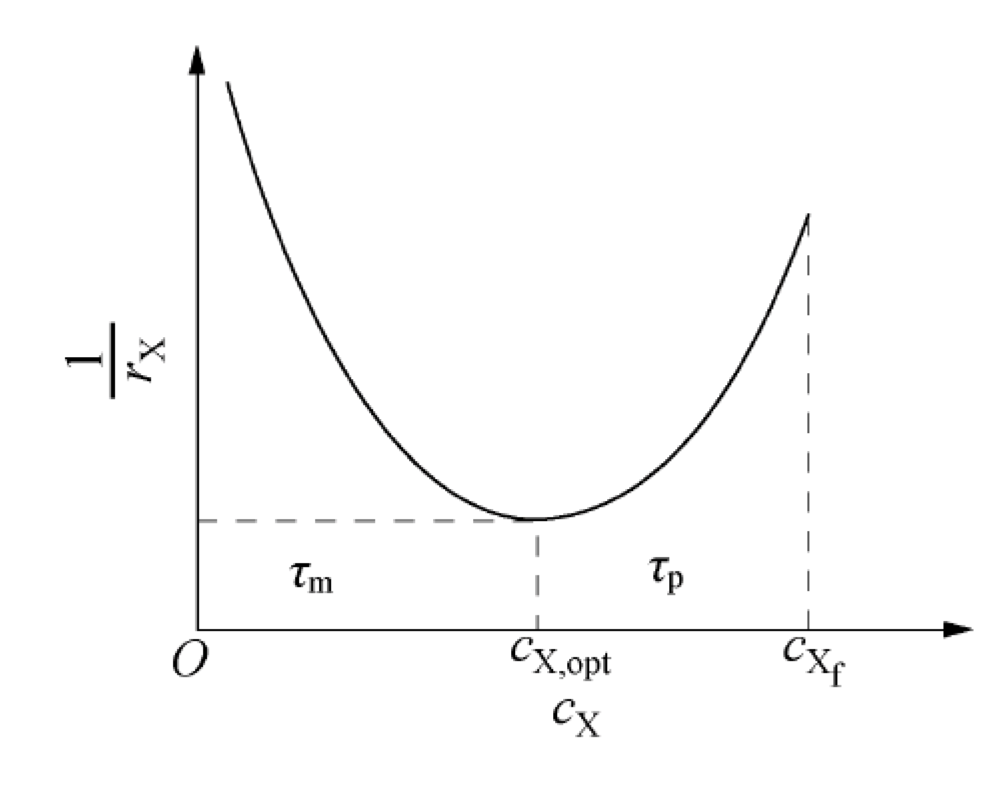


图 8-30　CSTR 与 CPFR 组合时确定反应器体积示意

如果由于某种原因，一定要采用 CPFR 操作，则可通过采用不同的加料、出料方式以改善 CPFR 的性能，亦可达到提高速率、减少所需反应器体积的目的。如图 8-31所示。

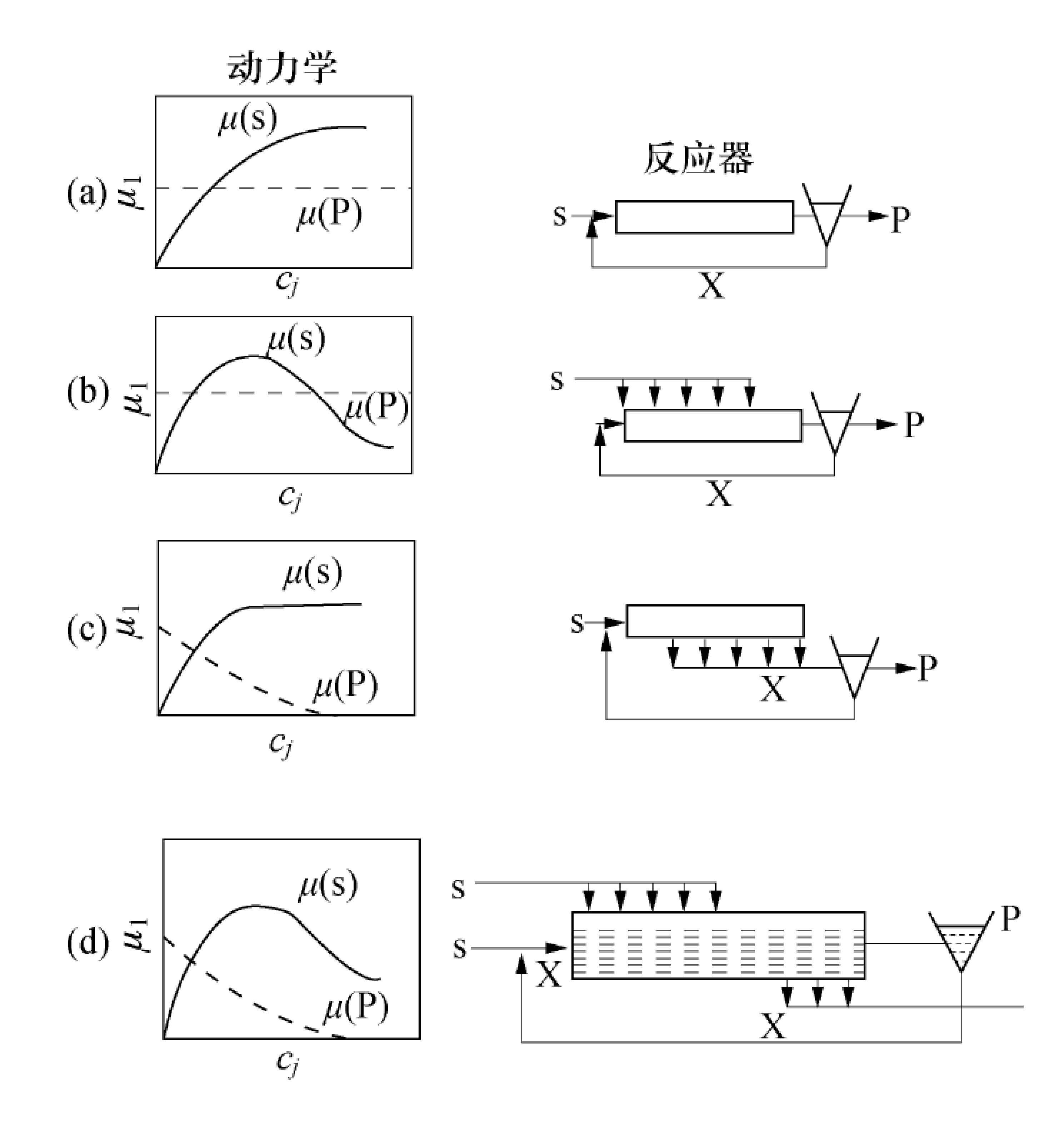


图 8-31　不同动力学时 CPFR 的最佳加料方式

图 8-31（a）表示的是无抑制情况，为了保证 CPFR 正常连续操作，可使细胞循环回到反应器入口，并可提高细胞生长速率；图 8-31（b）表示的是底物对细胞生长有抑制的情况，为了减少底物抑制，沿 CPFR 轴向位置实施多点加料，以使反应器维持在尽可能低的底物浓度，以减少其抑制作用；图 8-31（c）为反应产物有抑制时的情况，为了减少产物抑制，应及时将反应产物排出反应器以外，降低反应器中产物浓度；图 8-31（d）为底物和产物均对细胞生长有抑制时的情况，故沿反应器轴方向实施多点加入底物和多点排出产物的措施以减少其抑制作用。

根据上述对种种反应器情况的分析，如果仍以达到某一反应程度（例如转化率 X_S）时所需反应器有效体积大小作为比较的标准，对各种反应动力学可归纳为 3 种情况。

第 1 种动力学是浓度与速率的关系为单调上升的关系，即随着反应组分浓度的增加，反应速率亦增加，浓度下降，速率亦下降。这是简单酶催化反应和很多化学反应的动力学特点，对此种反应动力学采用 CPFR 有利。

第 2 种动力学是反应组分浓度与速率是单调下降的关系，即随着组分浓度的升高，反应

速率在下降。这种情况比较少见，它仅出现在化学反应动力学中反应级数为负值的情况。对此种动力学采用 CSTR 有利于减少所需要的体积。

第 3 种动力学为随着浓度的变化反应速率有最大值的情况，一般出现在细胞反应过程、自催化反应过程。此时采用 CSTR 与 CPFR 相串联的形式有利于减少反应器体积。

上述 3 种动力学情况分别表示为图 8-32 中的曲线 1、2、3。

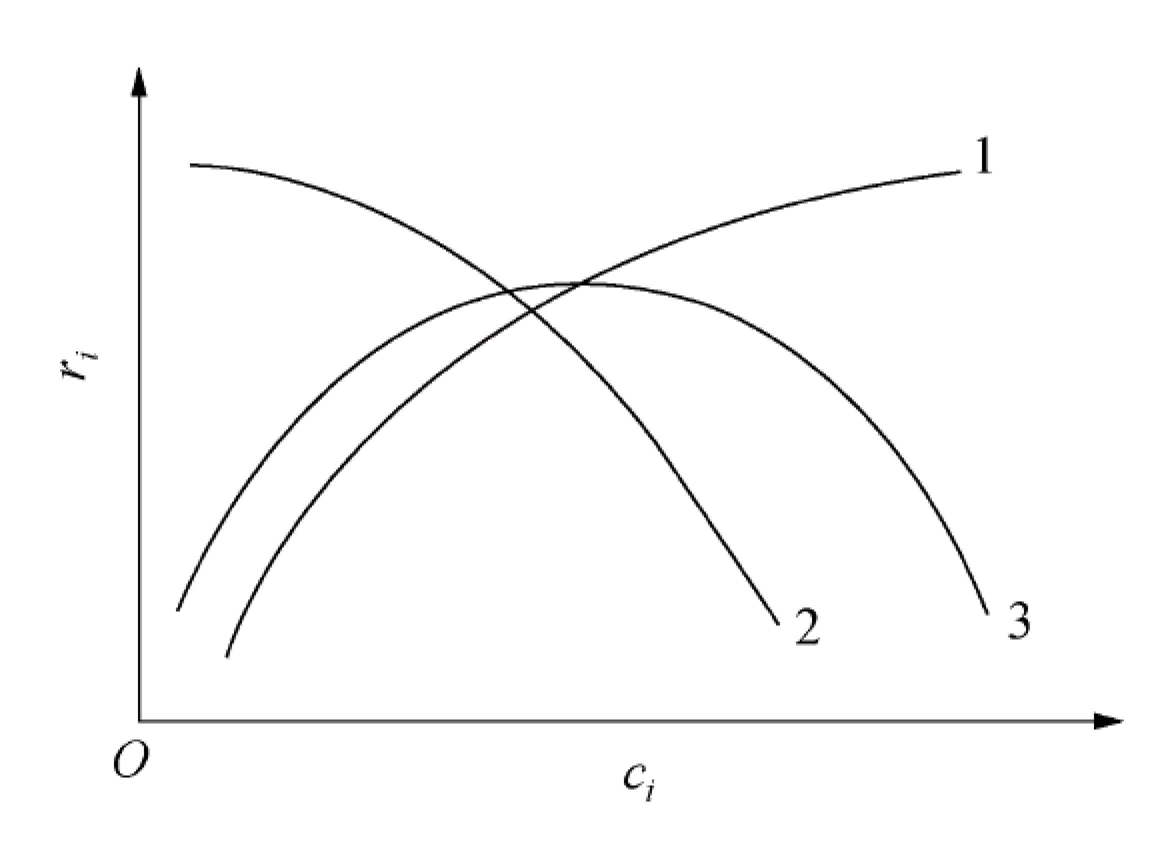


图 8-32　不同的 $r_i - c_i$ 的动力学关系

1：速率与浓度单调上升；2：速率与浓度单调下降；3：速率与浓度有最大值

需要特别指出的是，上述讨论仅仅是从如何使反应速率最大，所需反应器体积最小的角度来考虑反应器的选择。而实际上选用何种反应器除了要考虑上述因素外，还要考虑到一些其他因素。例如，在细胞反应中，某些次级代谢产物的生成速率 r_P 达到最大值时所需要的时间要比细胞生长速率达到最大值时延迟一段时间 t_M，如果为了追求最大的 r_P 值，在连续操作的反应器中则必须保持 $t = t_M$ 的条件，即细胞在反应器中的平均停留时间必须等于细胞的成熟时间 t_M。对 CSTR，由于返混的作用，将使一部分细胞在反应器中停留时间小于 t_M，因而这一部分细胞对生成代谢产物没有作出贡献，而只有另外一部分细胞由于其 $t \geq t_M$ 才能生成代谢产物。而对 CPFR，由于无返混存在，所有细胞在反应器的停留时间皆可控制在 $t = t_M$ 的水平上，可使代谢产物的产率达到最好的结果。还有一些次级代谢产物，如青霉素，在反应器停留时间过长会分解，CSTR 中由于有一部分可能 $t > t_M$，易分解，而 CPFR 则易控制为 t_M，代谢产物不易分解。

综上所述，要选择适宜的反应器类型和操作方式需要综合考虑多方面因素，才能做出客观的选择。

8.3.5　连续反应过程的应用

1. 确定最佳培养条件　在连续培养恒化器中的菌体浓度、比生长速率、限制性底物浓度和产物浓度等均恒定不变，所培养的微生物始终处于一种恒定的物理、化学环境之中，为研究微生物对环境因子的响应以及确定最佳环境条件提供了极为重要和有用的工具。

在生物反应过程中，一般关心的是：①如何获得最大的生产强度；②在怎样的环境条件、生长速率下可取得最高的转化率；③控制什么限制性底物，在何种浓度水平下才能最大限度地避免其他副产物形成。应用连续培养技术，可以比较容易地获取上述有用信息。

例如，培养面包酵母，以葡萄糖为限制性底物，在不同稀释率下进行连续培养，测稳态下的菌体浓度、糖浓度、乙醇浓度以及计算出表观产率系数，可得如图 8-33 所示的培养结果。

由图 8-33(a)可知在 $D = 0.1 \sim 0.25$ 培养能够取得培养的最高转化率 $Y_{X/S} = 0.5\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$；在此种稀释率 D 下，所对应的葡萄糖浓度 $s \leq 0.12\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$，如图 8-33(b)所示；在这一底物浓度下，乙醇的生产比速率 $r_P = 0$，如图 8-33(c)所示。根据这些参数间的关系，可知在培养面包酵母时，应控制发酵液中面包酵母的生长比速率 μ 为 $0.1 \sim 0.25\text{h}^{-1}$；选择合适的初糖浓度 c_{s0}，使培养操作时的底物浓度 $c_s \leq 0.12\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$；在此条件下培养，基本无乙醇生成，转化率可高达 50%。

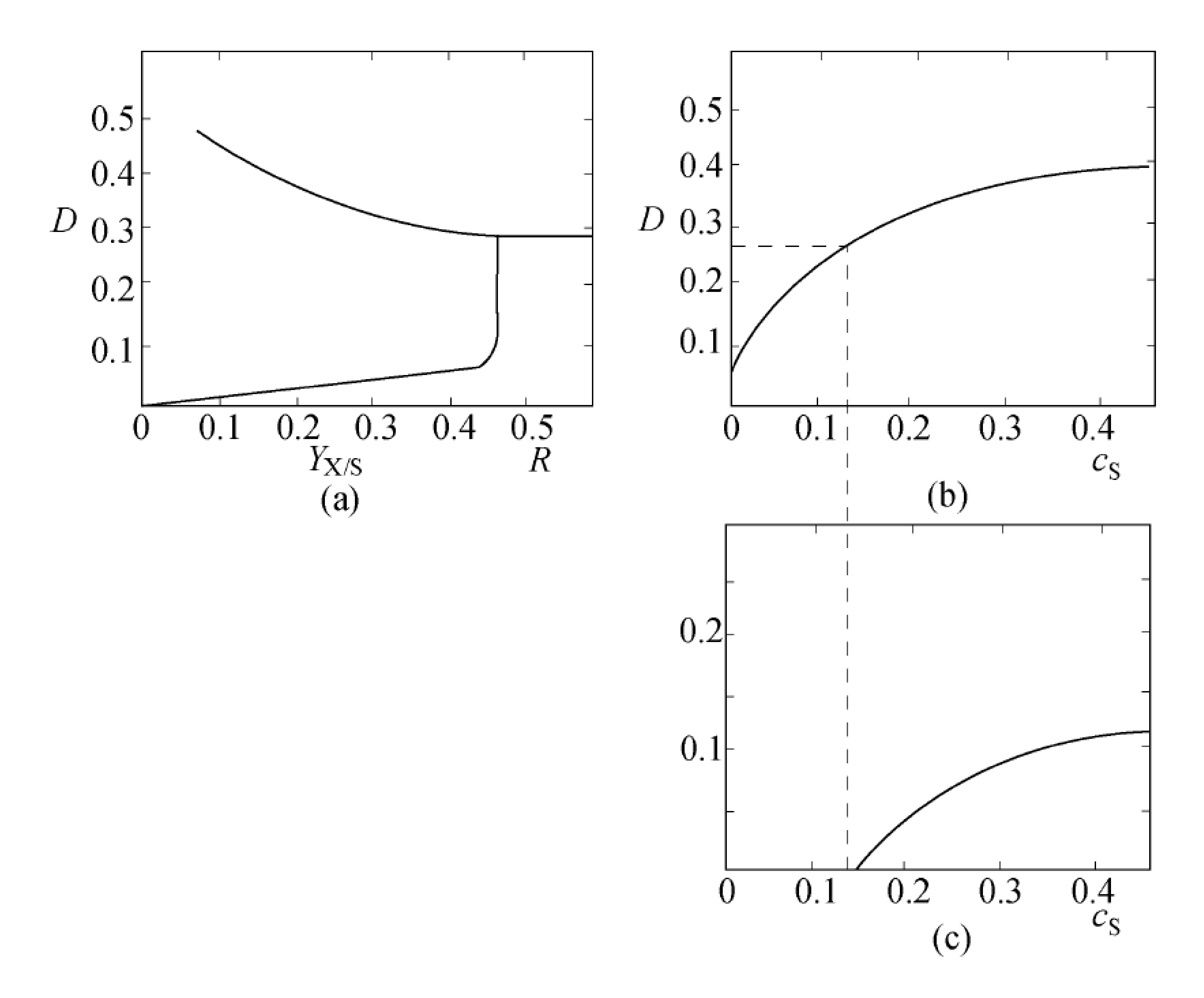


图 8-33　连续培养面包酵母时各参数间的关系

测定培养过程中的菌体浓度 c_X，以及生产中容易控制的参数如氧摄取比速率 q_{O_2}、二氧化碳排出比速率 q_{CO_2}，并计算呼吸商 RQ（q_{CO_2}/q_{O_2}），可得如图 8-34 所示的结果。

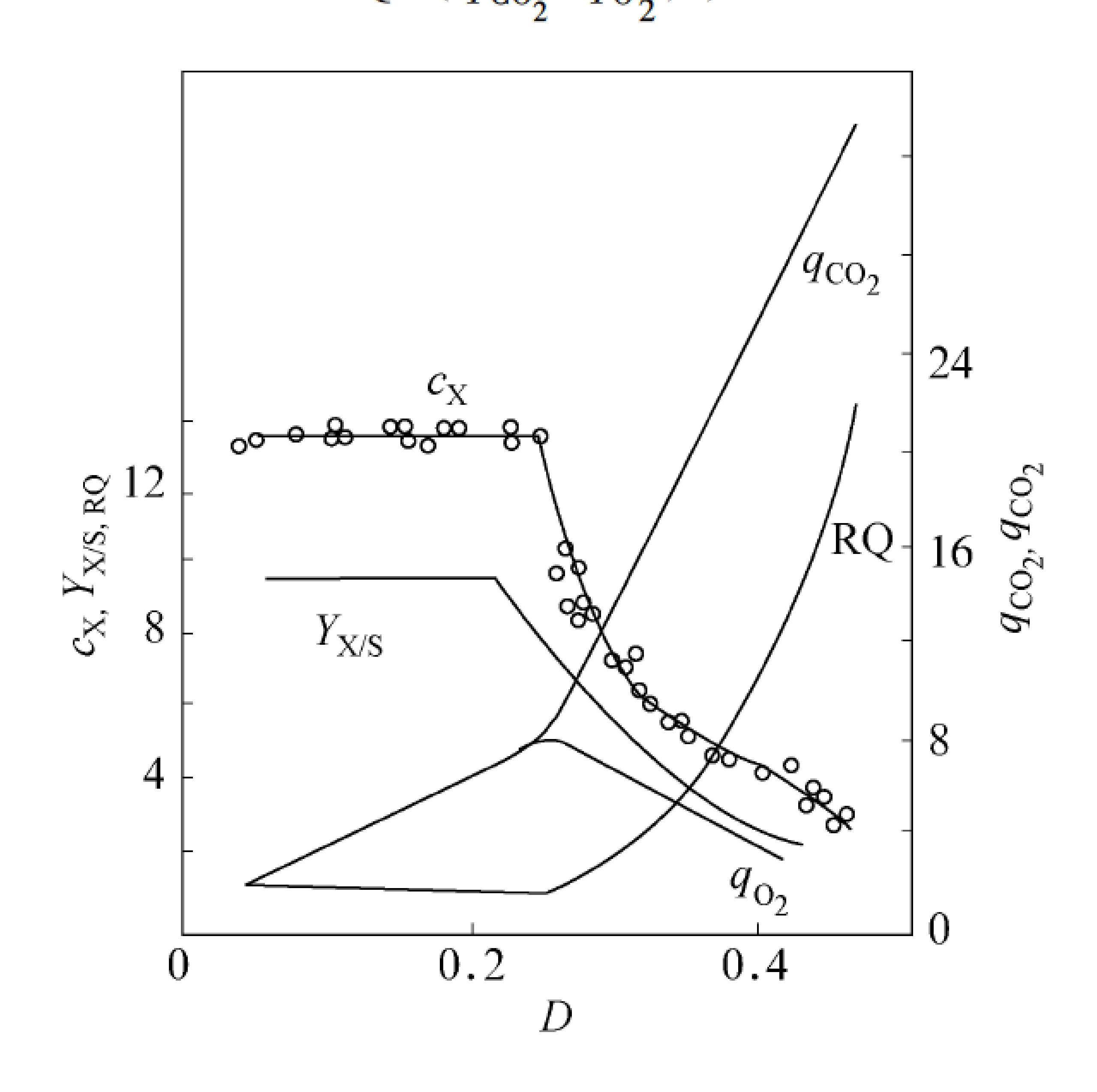


图 8-34　连续培养面包酵母过程中各种参数与呼吸活性间的关系

由图 8-33 及图 8-34 可知，生产强度的最大值是在稀释率 $D=0.25\mathrm{h}^{-1}$ 下取得的，为 $3.5\mathrm{g\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}}$，应控制呼吸商 RQ 为 1。

综合上述结果，可得培养面包酵母的最佳培养条件为：$s=0.12\mathrm{g\cdot L^{-1}}$；$\mu=0.25\mathrm{h}^{-1}$，RQ = 1，此时生产强度及底物的转化率均可取得最大值。以此培养条件，采用连续培养或流加培养就能够获得最好的培养结果。事实上，现代工业化规模生产面包酵母的流加培养和操作控制技术就是建立在上述研究结果基础上的。

2. 富集、选育特殊性状的菌种　应用连续培养技术，可以建立高度选择性的环境条件以筛选和富集培养专一类型的微生物。该问题包含两方面的内容：其一是为了找出能完成专

一功能的微生物，必须针对具体选定的微生物群，根据所要求的功能建立高度选择的培养环境，使得无此功能的微生物在此环境中不能生长或极少生长，从而获得具有该功能的微生物；其二是在上述的选择培养中，最终得以保留的是怎样生长性状的菌株。

第一点是一个选择环境的问题。可以通过特殊的限制性底物和极端的培养物理条件实现。例如，选育能够利用碳氢化合物的微生物，只要在一定的稀释率下（通常选育时的稀释率应比已有菌种的操作稀释率大一些），培养即可；又如所选育的是酵母而非细菌，则可在培养中调低 pH 3 ~4，或添加抗生素如青霉素来实现；如果所选育的是嗜热微生物，则在高温度下连续培养，高温菌自然被富集。因此，应用独特的限制性底物、培养的温度、pH 极端值、添加各种各样的生长促进或抑制物质等能够建立起具有高度选择性的培养环境。

第二点是在连续培养过程中生长速率各异的菌种的“去”“留”问题。类似于在连续培养过程中污染杂菌在什么时候和以何种方式残存在系统之中的问题。

假设一连续培养微生物 X 的过程中被 Y 或 Z 或 W 微生物所污染。其中杂菌 Y 在给定的限制性底物 S 中的生长比速率 $\mu_Y < \mu_X$；杂菌 Z 在 S 中的生长比速率 $\mu_Z > \mu_X$；而杂菌 W 在 S 中的生长比速率 μ_W 则与 S 的浓度有关。三种杂菌 Y、Z、W 在连续培养中与微生物 X 的生长关系如图 8-35 所示。

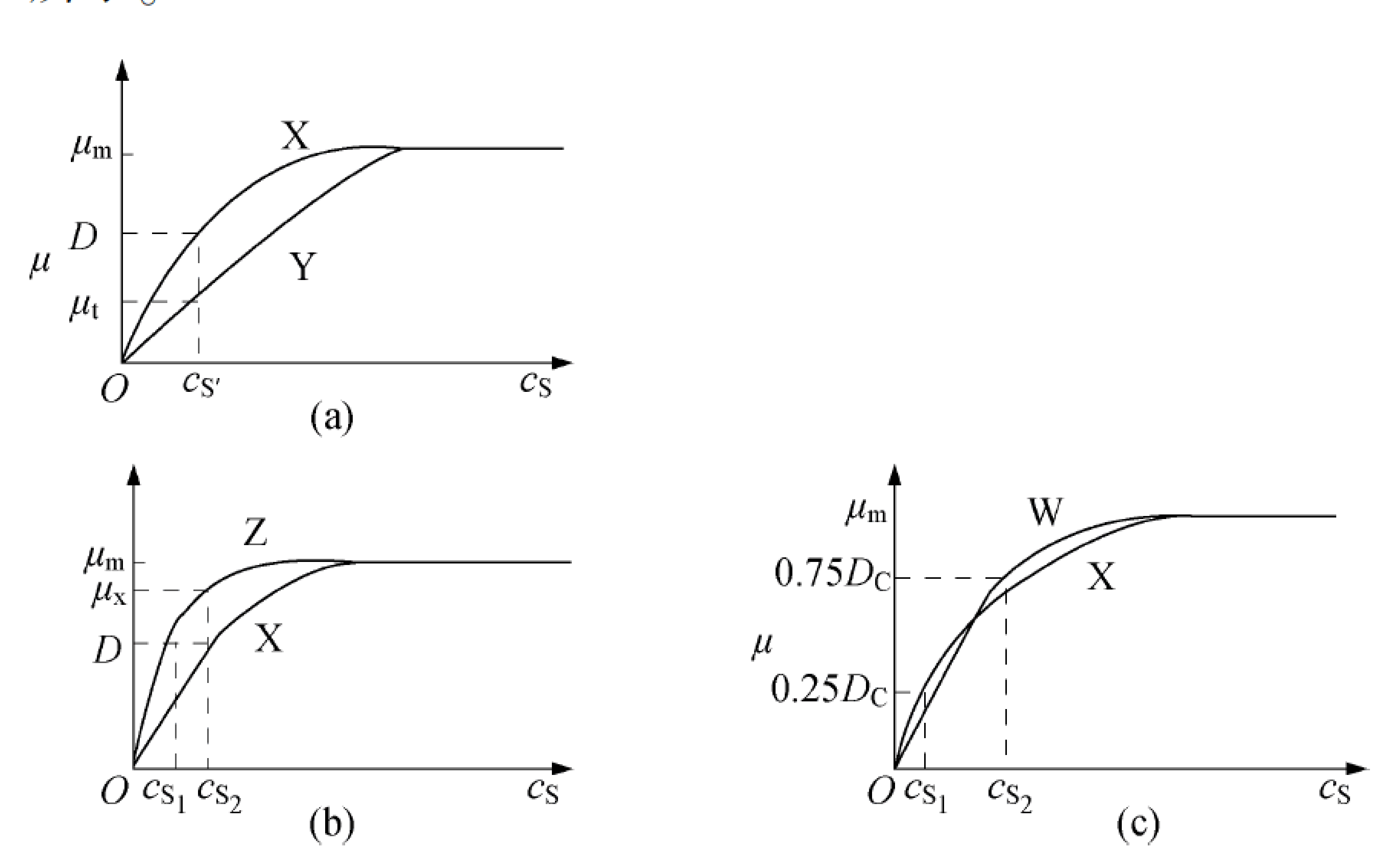


图 8-35　杂菌 Y、Z 和 W 在连续培养中生长比速率与限制性底物浓度的关系

（a） Y 与 X；（b） Z 与 X；（c） W 与 X

根据连续培养理论，一种微生物在培养过程中的积累为生长与稀释之差：

细胞积累 = 生长量 − 流出量

即：
$$\frac{dc_X}{dt} = \mu c_X - Dc_X \tag{8-186}$$

对于杂菌 Y，如图 8-35（a）所示，在一定 c_S 下，μ_Y 小于正常培养微生物 X 下的稀释率 D_X，因：

$$\frac{dc_Y}{dt} = \mu_Y c_Y - D_X c_Y \tag{8-187}$$

且有 $\mu_Y < D_X$，故 $\frac{dc_Y}{dt}$ 为负值。结果杂菌 Y 不能残存在培养系统中。

对于杂菌 Z，如图 8-35（b）所示，在一定 c_S 下，μ_Z 大于正常培养微生物 X 下的稀释率 D_X，因：

$$\frac{dc_Z}{dt} = \mu_Z c_Z - D_X c_Z \qquad (8\text{-}188)$$

且有 $\frac{dc_Z}{dt}$ 为正值。结果杂菌 Z 将残存在培养系统中，其残存方式是：

由于 $dc_Z/dt > 0$，微生物 Z 积累，根据连续培养理论，Z 的积累将导致限制性底物浓度 c_S 的下降，下降至 $c_{S'}$ 时，有 $\mu_Z = D_X$，建立了一个在 c_S' 下的新稳定状态。在 c_S' 下，微生物 X 不能与 Z 抗争，因此时 X 的生长比速率 $\mu'_X < D$，微生物 X 将从培养系统中洗出。

对于杂菌 W，W 的残存与否取决于操作的稀释率，如图 8-35（c）所示，在 $D = 0.25D_c$ 时，W 不可能与 X 竞争，如 Y 与 X 的情形，W 终将被洗出；当 $D = 0.75D_c$ 时，X 不可能与 W 竞争，如 Z 与 X 的情形，X 终将被洗出，W 在系统中残存。

可见，在选择性富集培养过程中，最后系统中保留的是：在此环境中的生长比速率最大的微生物。

3. 连续发酵与产物的形成 类似于分批发酵过程，连续发酵产物形成的动力学类型亦可分为 3 类，即生长耦联型、生长部分耦联型和非生长耦联型。然而，与分批发酵过程不同的是，由于生长受到限制性底物的限制，许多次级代谢产物与生长平行产生。

连续培养的方法能够提供高度选择性环境，为研究环境因子，特别是限制性底物种类、浓度与产物形成之间的关系提供了一个非常有用的工具。所要研究的重要问题之一就是：专一的限制性底物怎样影响细胞的产物生成比速率？虽然至今尚未清楚地解释这一问题，但是在一些研究中却获得了对发酵生产极为有用的数据。如在各种限制性底物对链球菌产生乳酸的研究中得到如表 8-2 所示的结果。

表 8-2 在连续培养中链球菌变异株由葡萄糖生成乳酸

限制性营养物	稀释率（h^{-1}）	细胞产酸力（$g_p \cdot g_x^{-1}$）	产物生成比速率（$g_p \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$）	乳酸（$g \cdot L^{-1}$）
葡萄糖	0. 017	5. 4	0. 092	4. 0
葡萄糖	0. 034	6. 1	0. 21	4. 0
葡萄糖	0. 051	6. 0	0. 31	3. 8
氮源	0. 034	26. 3	0. 89	10. 0
磷酸盐	0. 034	80. 0	2. 7	4. 8

可见，不同的限制性底物对产物生成比速率的影响差别巨大，为提高生产强度选择合适的限制性物质非常重要。此例中，当以氮源或磷酸盐为限制性底物时，使葡萄糖的代谢与生长速率无关，即生长与葡萄糖代谢非耦联，促使葡萄糖的分解代谢产物——乳酸大量产生和积累，菌种的产物生成比速率提高了一个数量级。类似这种恰当地使用限制性底物，促使形成产物的主要成分乳酸与生长非耦联、调节控制产物生成的代谢机制，从而增强细胞生成产物的能力，提高产物生成比速率的方法，对发酵生产具有极为重要的理论研究和实践意义。

4. 微生物遗传稳定性的研究 进行连续培养时，理论上微生物可以无限地生长，因而也是研究其遗传稳定性的好方法。早在 20 世纪 50 年代，许多研究人员已用连续培养的方法研究微生物的自然变异率或化学诱变率。近年来，基因操作技术的发展，使许多昂贵的具有重要生理活性的人体蛋白可利用微生物来大量生产。通常利用重组质粒将外源目的基因转入宿主菌内，若该重组质粒丢失或有关基因发生突变，基因工程菌即失去生产能力，因而其质粒

稳定性十分重要。连续培养已广泛用于基因工程菌的质粒稳定性研究，例如生长速率（稀释率）、限制性基质、质粒与宿主等对质粒稳定性的影响。以葡萄糖为限制性基质的合成培养基连续培养 *E. coli* W 3110（pEC 901）时发现，基因工程菌以一定频率产生丢失质粒的变异菌，同时丢失质粒的个体因较原基因工程菌具有生长的优势，一旦出现即很快将原基因工程菌淘汰。该基因工程菌在高生长比速率下有较高质粒稳定性，这一特点在进行高密度发酵时可作为发酵控制的依据。

目前，除大规模工业化生产单细胞蛋白、工业化处理废水采用连续培养技术之外，其他发酵产物的工业生产极少采用连续培养技术。这是因为：①杂菌污染问题。因连续培养以长期、稳定连续运转为前提，在整个培养过程中，必需不断地供给无菌的新鲜培养基，好氧发酵时，必需同时供给大量的无菌空气，这两种供给的过程中极易带来杂菌的污染，长期保持连续培养的无杂菌状态非常困难。②变异问题。因工业化生产所用菌株大都是通过人工诱变处理的高度变异株，在长期的连续培养过程中容易使回复突变菌株逐渐积累，最后取得生长优势。另外，因为发酵过程的目的是要制造成本最低的产品，为此目的，其一是使原料以最大的转化率和最大的体积生产强度转化为产物；其二是使发酵结束时发酵液中含有尽可能高的产物浓度，以缩小产物分离提取系统的规模和操作的费用。一些发酵过程其产物的分离提取费用占生产总成本的 40% 以上；而对于大多数抗生素和精细化学品的发酵生产，其本身就是一个高成本分离过程的生产过程。因在连续培养过程中，流出的发酵液中产物浓度一般比分批发酵和流加培养的低，结果加重了分离提取的负荷，在生产成本上没有竞争力。但是连续培养可提供一个微生物代谢的高度选择的最佳环境，在生产强度、转化率上能够具有优势，只要在获取高产物浓度上取得技术突破，便会增进其竞争优势。可见，连续培养的方法对于发酵产物的工业化生产仍极有潜力。

8.4　流加反应过程

流加反应过程的主要特征是，反应过程中，反应物连续或分批加入，产物一次性或间断性排出。因此，流加反应过程既有分批操作的非稳态的分批特性，也有连续反应过程的连续加料与出料的有关特性。由于加料与排料得到控制，因此流加反应过程的主要优点如下：

（1）底物和副产物的浓度得到控制，酶或细胞的反应环境可处于稳定的最优条件。

（2）可对反应过程灵活调控，获得较高的细胞密度、产物浓度和生成速率。

（3）流加反应过程可应用于连续操作不合适的情况，而过程特性又优于分批反应过程。例如，它既可避免细胞分批培养生产能力较低的缺点，也能降低连续过程的菌种变异和杂菌污染的可能性。

但是，流加反应过程（补料分批培养）并非十全十美，它也有一些缺点：①用于反馈控制的附属设备比较贵；②在没有反馈控制的系统中，料液的添加程序是预先固定的。当微生物的生长方式（即菌体生长）随时间变化的情况与预想的不一致时，不能进行有效地调节；③要求操作者具有较高的操作技能。另外，补料分批培养要解决的一个重要问题是向发酵罐中加入什么物质以及如何加入这些物质。目前在生产上还只是凭经验确定，或根据少数几次检测的静态参数设定控制点，带有一定盲目性，很难同步地满足微生物生长和产物合成的需要，也不可能完全避免基质的调控反应。

很多生物反应过程是以流加操作方式进行的，其主要原因是：对酶反应或细胞的生长与

代谢过程普遍存在底物或产物的抑制作用，并且有些过程需要在反应的特定时间内加入前体等物质，对具有这类特征的反应，其操作模式多为流加底物和阶段性地出料，对此唯有灵活性比较大的流加操作方式比较适合；其次，一般生物反应过程的优化从操作方式、操作条件和反应器型号进行，在操作条件和反应器型号一定的条件下，为提高宏观反应过程速率，过程优化必须依赖操作方式的优化。而在操作方式中，流加反应过程是生物反应过程的主要优化手段之一。这种操作方式对生物反应过程的研究与开发也具有重要价值，因此目前得到国内外的充分重视。

生物反应器的流加反应过程，根据不同的酶反应和细胞反应的特征，其类型变化较大，对细胞培养过程，从过程的分批特性和补料方式上进行区分，有各种类型，其中可概括为下述 3 种典型方式：补料分批培养、反复补料分批培养和反复分批培养。这三种操作方式的共同之处是，它们都在分批培养的基础上，以补料方式在同一批次中加入底物和（或）放出部分培养物的方式对分批培养过程进行优化。其中，补料分批培养是以连续流加底物的方法为细胞的生长与代谢提供最佳条件，在培养过程中，反复分批培养和反复补料分批培养，通过阶段性地排出一定量的培养液同时加入一定量新鲜培养液进行多次的分批培养或补料分批培养。它们的差别在于培养基的加入方式和培养液排出方式的不同。在上述各种操作方法中，应用最广泛的是补料分批培养，若要对过程进行进一步的优化，也常使用反复补料分批培养。

8.4.1　流加过程动力学

补料分批培养的优化操作与控制是以对过程的分析和数学模型的建立为基础的，为此必须明确过程的各种变量与参数的性质及其相互关系。这些变量与参数分为状态变量、操作变量和过程参数。生物反应器的过程状态指能充分表示在任何反应时间、反应情况的一组相互依赖的变量及其数值，这些变量称为状态变量。属于状态变量的有 pH、温度、培养液中的细胞浓度、底物和产物浓度等。状态变量的变化由操作变量引起，这些操作变量包括加料速率、加料中的底物浓度、搅拌速度和通气速率等。状态变量的变化反映在过程参数或细胞的生长参数上，它包括细胞的生长比速率、得率系数、氧和 CO_2 的传递速率等。在补料分批培养时，由加料速率这一操作变量引起的状态变量的变化，一般用过程的状态方程描述，状态方程与质量平衡和能量平衡有关。

由于补料分批培养属于分批培养与连续培养之间的过渡态操作，因此随着底物施加速率的变化，培养液的组成、细胞浓度和培养液体积等过程状态变量均随时间发生变化，状态变量的估计与质量衡算都以总量的变化来进行。

若以 c 表示培养液中各组分的浓度（包括细胞质量浓度和底物浓度），以 V_R 表示反应器的有效体积，则其总量衡算式为

$$\frac{d(cV_R)}{dt} = V_R\frac{dc}{dt} + c\frac{d(V_R)}{dt} \tag{8-189}$$

由于反应器有效体积的增量与加料速率相等，因此有

$$\frac{d(V_R)}{dt} = F \tag{8-190}$$

式中：F 为加料速率（$L \cdot h^{-1}$）。

所以：

$$\frac{d(cV_R)}{dt} = V_R\frac{dc}{dt} + c\frac{d(V_R)}{dt} = V_R r + cF \tag{8-191}$$

式中：r 为以各组分为基准的反应速率（$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）。

于是：

$$\frac{dc}{dt} = r + \frac{F}{V_R}(c_0 - c) = r + D(c_0 - c) \tag{8-192}$$

式中：c_0 为加料中的组分浓度（$g \cdot L^{-1}$）；D 为稀释率，$D = \frac{F}{V_R}$，指加料流量与反应器有效体积之比（h^{-1}）。

由上式可以得出细胞的衡算式为

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu c_X - Dc_X = (\mu - D)c_X \tag{8-193}$$

式中：μ 为细胞比生长速率（h^{-1}）；c_X 为细胞质量浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

需要根据底物在反应中的消耗情况求解底物的衡算式，当底物的消耗仅用于细胞生长时，底物的变化速率为：

$$\frac{dc_S}{dt} = D(c_{S_0} - c_S) - \frac{\mu}{Y_{X/S}}c_X \tag{8-194}$$

式中：c_{S_0}、c_S 为补料中、培养液中底物的浓度（$g \cdot L^{-1}$）；$Y_{X/S}$ 为细胞对底物的得率系数（$g \cdot g^{-1}$）。

当底物用于细胞生长和维持活动时，有：

$$\frac{dc_S}{dt} = D(c_{S_0} - c_S) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}^*} + m\right)c_X \tag{8-195}$$

式中：m 为维持常数（$g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$）；$Y_{X/S}^*$ 为细胞对底物的理论得率系数（$g \cdot g^{-1}$）。

当底物用于细胞生长、维持活动和产物生成时，有：

$$\frac{dc_S}{dt} = D(c_{S_0} - c_S) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}^*} + m + q_P\right)c_X \tag{8-196}$$

式中：q_P 为产物生成比速率。

在判明反应特征的条件下，产物的衡算式为

$$\frac{d(c_P V_R)}{dt} = q_P c_X V_R \tag{8-197}$$

因此：

$$\frac{dc_P}{dt} = q_P c_X - Dc_P \tag{8-198}$$

以上各式中产物生成比速率 q_P 的计算需在判明反应特征的条件下，使用 Gadden 反应类型的有关表达式进行。

对不同的流加控制方法，加料速率 F 和稀释率 D 的变化规律不同，并且除恒流量流加情况以外，其他均为时间的函数，因此状态方程的差异，反映了各种补料方式的不同。以下分别讨论几种典型的控制方式的操作模型。

1. 恒速流加操作模型　对补料分批培养，若以底物仅消耗于细胞生长而与维持活动或产物生成无关的过程为例，其底物的消耗速率方程式为式（8-194）。假定在过程早期细胞生长速率保持最大生长比速率，$\mu = \mu_{max}$，对此方程乘以 $Y_{X/S}$ 后与式（8-193）相加得到：

$$\frac{d(c_X + Y_{X/S}c_S)}{dt} = \frac{d[c_X - Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S)]}{dt} = -D[c_X - Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S)] \tag{8-199}$$

根据 $V_R = V_{R_0} + Ft$ 和 $D = \dfrac{F}{V_R}$，代入上式，分离变量并整理可得到：

$$\frac{\mathrm{d}\ln[c_X - Y_{X/S}(c_{S_0} - c_S)]}{\mathrm{d}t} = -\frac{\mathrm{d}\ln(V_{R_0} + Ft)}{\mathrm{d}t} \tag{8-200}$$

将初始条件 $c_S = c_S^0$、$c_X = c_{X_0}$、$V_R = V_{R_0}$ 代入上式，由于衡流量流加时 F 为定值，可以解出：

$$\frac{V_R}{V_{R_0}} = \frac{c_{X_0} - Y_{X/S}(c_S^0 - c_{S_0})}{c_X - Y_{X/S}(c_S^0 - c_S)} \tag{8-201}$$

式中：c_{S_0} 为加料开始时培养液中底物的浓度（$g \cdot L^{-1}$）；c_S^0 为补料中的底物浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

结合初值条件，可以推出：

$$c_X = \frac{V_{R_0} c_{S_0} \exp(\mu_{max} t)}{V_{R_0} + Ft} \tag{8-202}$$

把此式代入上式可以得到：

$$c_S = \frac{Fc_S^0 t + V_{R_0}\left(c_S^0 + \dfrac{c_{X_0}}{Y_{X/S}}\right) - \dfrac{1}{Y_{X/S}} V_{R_0} c_{X_0} \exp(\mu_{max} t)}{V_{R_0} + Ft} \tag{8-203}$$

由于以衡流量进料，在细胞生长的化学计量关系的约束下，细胞不能始终保持最大生长比速率增加，在细胞密度增加至一定数值后会发生下降，这时状态方程描述的过程特性有如图 8-36 所示的情况。由图可见，由于在整个过程中加料速率恒定，故细胞的生长状态在此操作参数下变化明显。在过程前期细胞密度较低时，流加速率相对较大，细胞可以最大生长比速率生长，随着过程进行，在细胞浓度较大时，因培养液体积在逐渐增大，稀释率和生长比速率逐渐减小，加料速率 F 的外部控制使细胞的生长达到拟稳态。

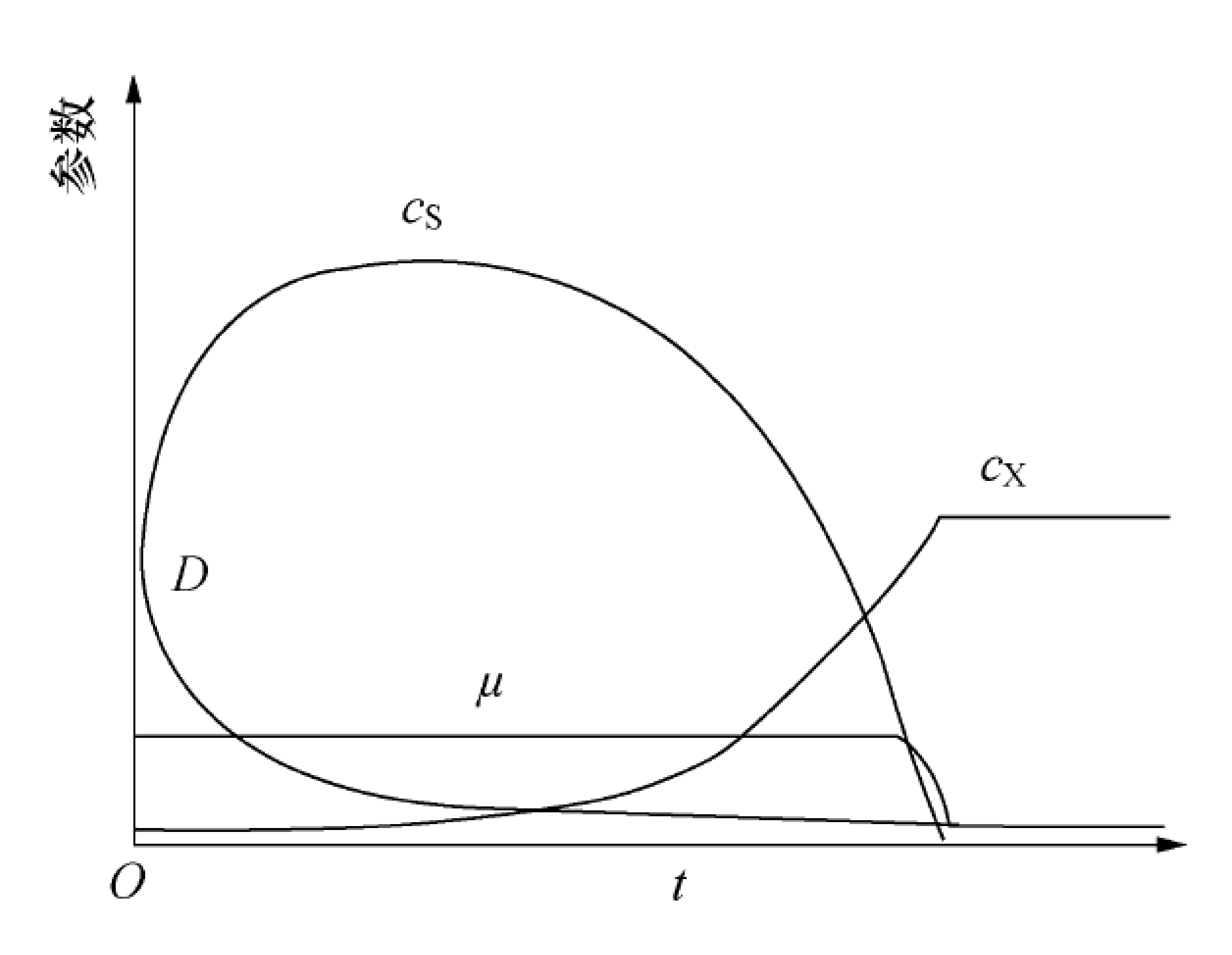


图 8-36　恒速流加分批培养过程的动态变化

过程在拟稳态时的特性为：$\dfrac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = 0$，细胞浓度恒定。拟稳态不是严格的拟稳态，此时底物浓度 c_S 很小，趋近于零但并不等于零。在 $\dfrac{\mathrm{d}c_X}{\mathrm{d}t} = 0$ 的条件下，由式（8-193）可以看出，$\mu = D$，因此由 Monod 方程可以求出拟稳态时的底物浓度 c_S 为

$$c_S = \frac{K_S D}{\mu_{max} - D} \tag{8-204}$$

拟稳态时生长比速率随时间的变化规律为

$$\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}t} = \frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t}\left(\frac{F}{V_R}\right) = -\frac{F^2}{V_R^2} = -\frac{F^2}{(V_{R_0} + Ft)^2} \tag{8-205}$$

假设反应器的体积较大，而初始体积 V_{R_0} 相对较小，经过长时间的流加培养后，有：

$$\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}t} = -\frac{1}{t^2} \tag{8-206}$$

这说明如果要使培养液中限制性基质浓度保持不变，同时细胞生长速率不降低，就不能够采用恒速流加。

恒速流加的实用价值在于它的操作简单，并且可用于调控细胞的生长速率与状态。例如，对重组大肠杆菌培养过程，在表达期用乳糖诱导 T7 启动子控制下的表达外源基因时，细胞的生长比速率应该控制在较低水平，故用乳糖的恒速流加可获细胞的高密度和基因的高表达。

2. 恒定生长参数的流加模型

1）恒定生长比速率 μ 的流加操作：使加料速率按指数规律增加，以保持限制性基质浓度保持不变，故称为指数流加。由于细胞的生长比速率为底物浓度的函数，因此指数流加可以使生长比速率 μ 保持恒定。在此条件下，根据生长比速率的定义：

$$\mu = \frac{1}{V_R c_X} \frac{d(V_R c_X)}{dt} \tag{8-207}$$

可以得到：

$$c_X V_R = c_{X_0} V_{R_0} \exp(\mu_0 t) \tag{8-208}$$

式中：μ_0 为开始流加时的生长比速率，并且有 $\mu_0 = \mu$ 。

若底物的消耗仅用于细胞生长，根据底物衡算式以及约束条件 $\frac{dc_S}{dt} = 0$ ，可以得到：

$$\mu c_X V_R = Y_{X/S} F(c_S^0 - c_S) \tag{8-209}$$

求得流加速率为

$$F(t) = \frac{\mu_0 c_X V_R}{Y_{X/S}(c_S^0 - c_S)} = \frac{\mu_0 c_{X_0} V_{R_0} \exp(\mu_0 t)}{Y_{X/S}(c_S^0 - c_S)} \tag{8-210}$$

由以上两式联立可得：

$$\frac{c_X}{c_{X_0}} = \frac{\exp(\mu_0 t)}{1 - A c_{X_0} + A c_{X_0} \exp(\mu_0 t)} \tag{8-211}$$

其中：

$$A = \frac{1}{Y_{X/S}(c_S^0 - c_S)} \tag{8-212}$$

并有：

$$\frac{V_R}{V_{R_0}} = 1 - A c_{X_0} + A c_{X_0} \exp(\mu_0 t) \tag{8-213}$$

2）恒定生长速率 r_X 的流加操作：这种形式的流加操作在整个操作过程中满足：$r_X = \mu c_X = r_{X_0}$ ，所以有

$$c_X = \frac{r_{X_0}}{\mu} \tag{8-214}$$

$$\frac{dc_X}{dt} = r_{X_0} \frac{d(1/\mu)}{dt} = -r_{X_0} \mu^{-2} \frac{d\mu}{dt} = -r_{X_0} \mu^{-2} \frac{d\mu}{dc_S} \frac{dc_S}{dt} \tag{8-215}$$

根据生物量衡算方程：

$$\frac{dc_X}{dt} = r_X - D c_X = r_X - D \frac{r_{X_0}}{\mu} \tag{8-216}$$

联立上两式（8-215，8-216）可以得到：

$$D = \frac{F}{V} = \mu \left(1 + \mu^{-2} \frac{d\mu}{dc_S} \frac{dc_S}{dt}\right) \tag{8-217}$$

由于基质平衡方程：

$$\frac{dc_S}{dt} = -Y_{S/X}\mu c_X + D(c_S^0 - c_S) \tag{8-218}$$

所以：

$$D = \frac{F}{V} = \frac{\frac{dc_S}{dt} + Y_{S/X}\mu c_X}{c_S^0 - c_S} \tag{8-219}$$

因此，可以得到：

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\mu(c_S^0 - c_S) - Y_{S/X}r_{X_0}}{1 - (c_S^0 - c_S)d[\ln(\mu)]/dc_S} \tag{8-220}$$

若细胞生长采用 Monod 方程，将方程无因次化，最后得：

$$\frac{ds}{d\theta} = \frac{\left(\frac{s}{s+a}\right)(1-s) - b}{1 - (1-s)\left[\frac{a}{s(s+a)}\right]} = \frac{s[-s^2 - (b-1)s - ab]}{s^2 + 2as - a} \tag{8-221}$$

其中 $$s = \frac{c_S}{c_S^0}, \quad \theta = \mu_{max}t, \quad a = \frac{K_S}{c_S^0}, \quad b = \frac{r_{X_0}}{\mu_{max}c_S^0 Y_{X/S}} \tag{8-222}$$

求出上式的解之后，就可以进一步求得流加速率随时间的变化关系。保持细胞生长速率 r_X 恒定的操作，具有随过程的进行生长比速率逐渐下降，而细胞浓度上升的特性，可满足某些过程对生长速率进行调控的要求。

3. 定值控制的流加模型 一般定值控制流加系指通过控制底物的加入速率以保持过程的参数不变，在定值控制中，常用的方法是保持培养液的 pH 或溶氧恒定，分别称为恒 pH 法（pH-STAT）和恒溶氧法（DO-STAT）。

1）恒 pH 流加操作：pH 对细胞的生理过程有着重要的影响，对多数细胞反应过程而言，当培养液中关键碳源浓度较高或细胞生长过快时，碳源代谢过程会产生一定量的有机酸，对细胞的生长会造成抑制作用。因此，通过 pH 的检测与底物的流加关联控制，可调控细胞的代谢过程，使培养液 pH 保持最佳值。

恒 pH 法系由 MacBean 和 Martin 等建立，既可用于补料分批培养，也可用于连续培养。其基本控制机制是，以同时分别流加作为碳源的底物和作为氮源的氨水等碱性物质的手段控制培养液的酸碱度，以酿酒酵母或大肠杆菌培养过程为例，分析如下：

以葡萄糖或蔗糖做碳源，以氨水做氮源的微生物的需氧培养过程的化学计量方程为

$$A(C_xH_yO_z) + B(NH_4^+) + C(O_2) \rightarrow D(C_\alpha H_\beta O_\sigma N_\gamma) + B(H^+) + E(CO_2) + F(H_2O) \tag{8-223}$$

式中：A、B、C、D、E、F 为化学计量系数；$C_xH_yO_z$、$C_\alpha H_\beta O_\sigma N_\gamma$ 为碳源、细胞的分子式。

化学计量式表明，每消耗 1mol 氢氧化铵时产生 1mol 质子，对质子的衡算式为：

$$\frac{dc_H}{dt} = \frac{F_B}{V_R}c_{H,B} - \frac{F_B}{V_R}c_{OH,B} + \frac{F_C}{V_R}c_{H,C} + \frac{\mu}{Y_{X/H}}c_X \tag{8-224}$$

式中：c_H 为培养液中的质子含量（$mol \cdot L^{-1}$）；$c_{H,B}$ 为流加碱液中的质子含量（$mol \cdot L^{-1}$）；$c_{H,C}$ 为流加培养基中的质子含量（$mol \cdot L^{-1}$）；$c_{OH,B}$ 为流加碱液的浓度（$mol \cdot L^{-1}$）；F_C 为底物溶液的流加速率（$L \cdot h^{-1}$）；F_B 为碱液的流加速率（$L \cdot h^{-1}$）；$Y_{X/H}$ 为细胞对质子的得率系数，对氢氧化铵来说，其值等于细胞对氢氧化铵的得率系数 $Y_{X/B}$（$g \cdot mol^{-1}$）。

底物溶液对碱液的相对流加速率 F_C/F_B 是重要的操作变量，以细胞质量为基准衡算，可以得出临界 F_C/F_B 为

$$\left(\frac{F_C}{F_B}\right)_C = \frac{Y_{X/B}c_{OH,B}}{c_S Y_{X/S}} \tag{8-225}$$

临界 F_C/F_B 与细胞反应的最优碳氮比有关，它取决于得率系数 $Y_{X/B}$ 和 $Y_{X/S}$ 的数值。

恒 pH 法的流加在重组菌的培养上应用较多，以细菌 *Alcaligenes latus* 在胞内生产聚 β – 羟基丁酸（PHB），实验说明恒 pH 优于恒流量流加和指数流加。对蔗糖溶液的恒流量流加、指数流加和恒 pH 法流加的细胞密度分别可达 24.7g · L^{-1}、32.9g · L^{-1}和 35.4g · L^{-1}。单位反应器体积的 PHB 浓度分别可达 8.5g · L^{-1}、16.3g · L^{-1}和 18.2g · L^{-1}。恒 pH 法所得的胞内 PHB 含量约为52%。如图8-37 所示为恒 pH 法的典型结果。实验条件为：$F_C/F_B=10$；流加蔗糖浓度和氨水浓度分别为 500g · L^{-1}和 200g · L^{-1}，pH = 6.5。

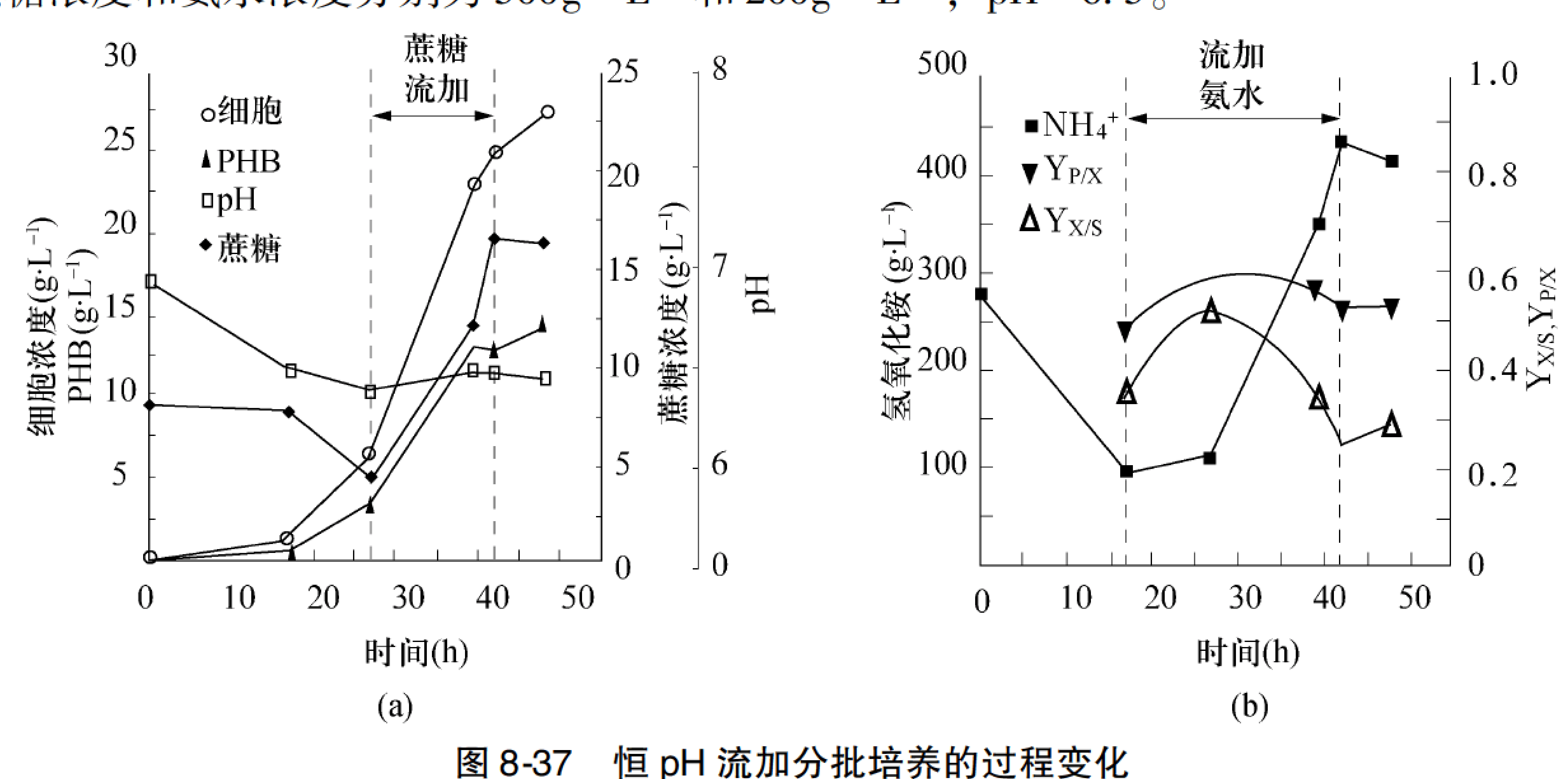


图 8-37　恒 pH 流加分批培养的过程变化

2）恒溶氧流加操作：其基本原理在于通过关联主要细胞反应的碳源代谢与氧的消耗，来进行底物流加速率与摄氧率的关联与控制。一般在细胞培养过程中，培养液中的浓度增大时，代谢反应速率较大，底物浓度则下降；而当底物浓度较高，并且细胞生长速率与浓度较大时，溶氧浓度则下降，因此可对溶氧浓度与底物的流加速率进行关联控制。

对多数细胞反应过程来讲，培养液中的溶氧浓度为工艺参数，要求保持定值，因此氧传递的推动力不能改变，在一定的反应器传氧效率下，细胞的摄氧率 OUR 必与氧传递速率 OTR 相等，即：

$$k_L a(c_{OL}^* - c_{OL}) = \frac{\mu}{Y_{X/O}}c_X \tag{8-226}$$

上式说明若要保持细胞的生长比速率 μ 不变，必须增大氧的传递系数和传递效率。因此，在恒溶氧法的过程控制时，必须通过不断提高通气速率、搅拌速度或通入纯氧等措施为细胞生长提供条件，通气速率、搅拌速度和流加速率是相互关联的操作变量。但是，在实际过程中，一般反应器的供氧条件不能随意改变，这时底物流加速率的控制必须与 OUR 的变化关联。在氧供需平衡时，参照上式，保持生长比速率 μ 不变的底物流加速率 $F(t)$ 可由下式决定：

$$V_{R_0} + F(t)t = \frac{\mu}{Y_{X/O}(\text{OUR})}c_{X_0}V_{R_0}\exp(\mu t) \tag{8-227}$$

式中：c_{X_0}、V_{R_0} 分别为流加开始的细胞质量浓度（$g \cdot L^{-1}$）和反应器有效体积（L）。

在摄氧率 OUR 等参数可在线检测的条件下，可由上式对发酵过程进行控制。

4. 反复流加操作模型 以上已指出恒流量的分批流加操作存在拟稳态的不足，对此可通过反复补料分批培养，即反复流加操作加以克服。通过这种操作手段，在每次放料后，重新开始恒速流加时，细胞的生长比速率得到提高。从过程的整体特性看，其细胞质量浓度和生长比速率均保持在较高的水平上，过程表现出拟稳态特性。图 8-38 显示对底物抑制动力学的动态过程模拟计算结果，模拟计算时有关参数分别以无量纲数值表示，即 $\bar{c}_X = c_X/(Y_{X/S}C_{S_0})$，$\bar{V} = V_R/V_{R_0}$，$\bar{c}_S = c_S/c_{S_0}$，$D = D/\mu_{max}$，$\bar{\mu} = \mu/\mu_{max}$，$\bar{t} = t\mu_{max}$。

反复补料分批培养时，长时间的拟稳态操作使过程具有连续过程的性质，反应器的生产能力也较大，这可通过对拟稳态的产物生成做近似计算说明。对以恒流量进行流加过程，流加开始时的产物浓度和反应器有效体积分别为 c_{P_0} 和 V_{R_0}，则由式（8-197）积分可得：

$$c_P = \frac{c_{P_0}V_{R_0}}{V_R} + \frac{1}{V_R}\int_0^t q_P c_X (V_{R_0} + Ft)\,dt \tag{8-228}$$

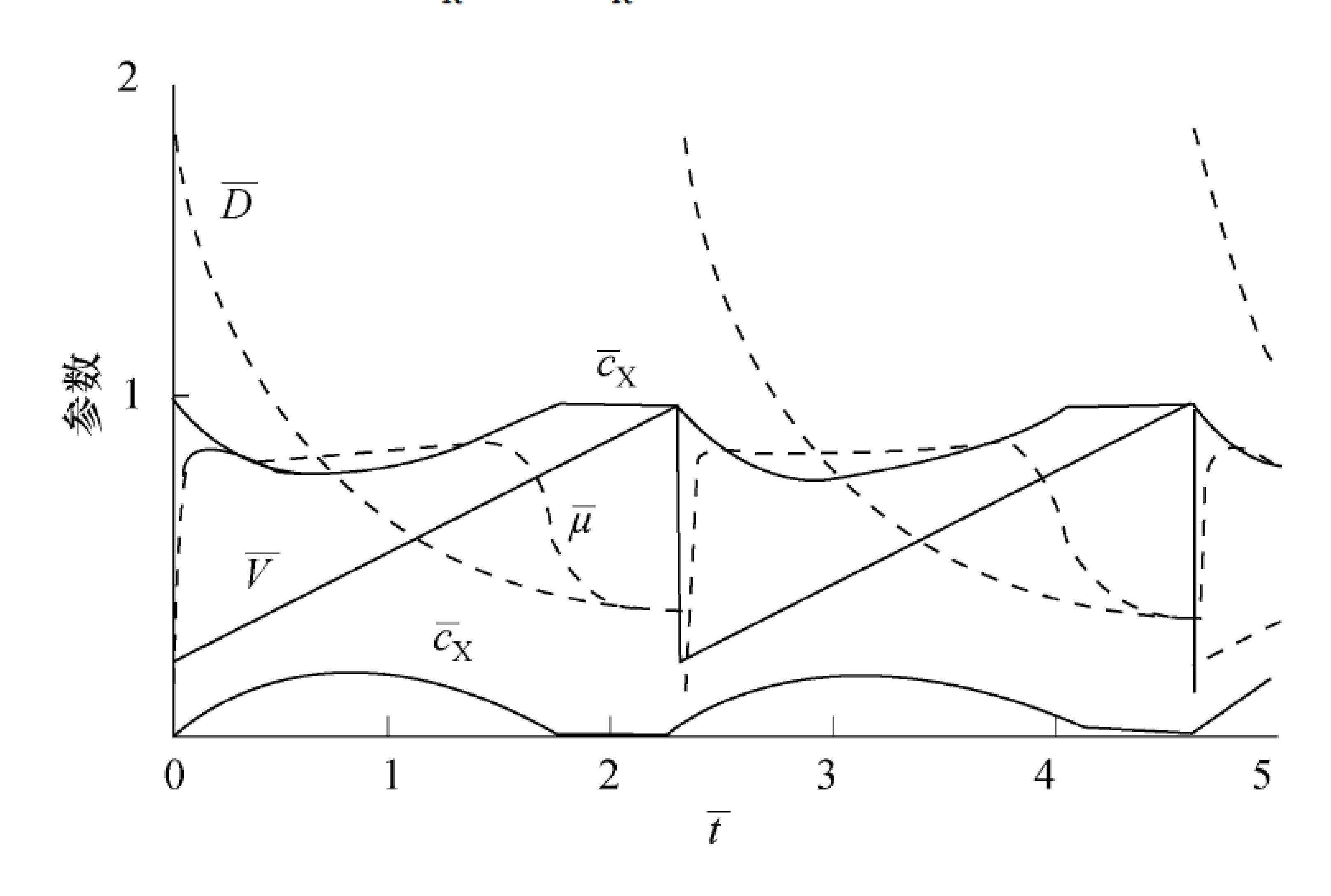


图 8-38 反复补料分批培养的动态模拟

假定拟稳态时的平均细胞浓度为 c_{Xm}，并令：

$$\eta = \frac{V_{Rm} - V_{R_0}}{V_{Rm}} \tag{8-229}$$

$$D_m = \frac{F}{V_{Rm}} \tag{8-230}$$

式中：η 为排料体积与流加结束时的体积 V_{Rm} 之比；D_m 为拟稳态时的稀释率（h^{-1}）。

令 $\gamma = 1 - \eta$，则可以计算得到拟稳态时的产物浓度 c_{Pm}。

$$c_{Pm} = \gamma c_{P_0} + c_{Xm}\int_0^t q_p(\gamma + D_m t)\,dt \tag{8-231}$$

设第一周期结束的产物浓度为 c_{P_1}，并有：

$$K = c_{Xm}\int_0^t q_p(\gamma + D_m t)\,dt \tag{8-232}$$

因此：

$$c_{Pm} = \gamma c_{P_0} + K \tag{8-233}$$

同理，对第二周期的产物浓度有：

$$c_{P_2} = \gamma c_{P_1} + K = \gamma^2 c_{P_0} + \gamma K + K \tag{8-234}$$

第 n 次周期结束时，产物浓度 c_{P_n} 为

$$c_{P_n} = \gamma^n c_{P_0} + K(\gamma^{n-1} + \gamma^{n-2} + \cdots + \gamma + 1) = \gamma^n c_{P_0} + K\frac{1-\gamma^n}{1-\gamma} \tag{8-235}$$

所以当 n 很大时，有：

$$c_P = \frac{K}{1-\gamma} = \frac{K}{\eta} \tag{8-236}$$

以上计算说明，反复补料分批培养的产物浓度在过程开始时增加较快，随培养过程进行，产物浓度趋于定值。另一方面，由于可以进行长时间的周期性操作，可以获得产物浓度恒定且大于反应器体积的培养液，因此单位反应器体积的产物生成速率较高。

8.4.2　流加过程控制技术

近年来，发酵物产量有了大幅度提高，一方面是由于高产菌株的不断更新，另一方面则是发酵工艺和设备条件的相继改进。补料通氨工艺的采用，促进了发酵单位的提高。这种中间控制的显著优势是生产菌的自溶期延迟，生物合成期延长，能够维持较高的产物增长幅度和较大的发酵液总体积，从而使产物的产量大幅度提高。例如：在真养产碱杆菌发酵生产聚羟基烷酸酯（PHB）的过程中，PHB 在不补糖的分批培养中的产量只有 13.8g · L^{-1}，占细胞干重的百分比为 73.3%；采用补糖以后，发酵液中 PHB 的含量可以达到 28.3g · L^{-1}，占细胞干重的百分比为 80.5%，其值比不补糖的操作方式分别提高了 105% 和 9.8%。又如，有些品种采用通氨工艺后，在其他条件配合下，发酵单位能提高 50% 左右。目前大部分发酵品种如谷氨酸、赖氨酸、酶制剂、有机酸、抗生素等均采用补料措施。在工业生产上，补料还经常作为纠正遗传性异常发酵的一个重要手段。

1. 补料的内容

所谓补料，顾名思义是在发酵过程中补充某些营养成分，以维持菌种的生理代谢活动和合成的需要。补料的内容大致可分为以下 4 个方面：

（1）补充微生物能源和碳源，如在发酵液中添加葡萄糖、饴糖、液化淀粉。作为消泡剂的天然油脂，有时也能同时起到补充碳源的作用。

（2）补充菌体所需要的氮源，如在发酵过程中添加蛋白胨、豆饼粉、花生饼、玉米浆、酵母膏和尿素等有机氮源。有的发酵过程还采用通入氨气和添加氨水等方法来补充氮源。由于其本身和代谢后的产物具有一定的酸碱度，以上氮源也可用于将发酵液控制在适宜的 pH 值范围以内。

（3）加入某些微生物生长或合成需要的微量元素或无机盐，如磷酸盐、硫酸盐、氯化钴等。

（4）在补料中加入适量的酶作用底物，是提高产诱导酶的微生物产酶量的重要措施。

2. 补料的原则　早期的发酵生产是采用一次投料发酵，到放罐的时候结束。这里存在着菌体生长和代谢的调节问题。菌体的生理调节活动和生物合成，除了取决于本身的遗传特性外，还取决于外界的营养、环境条件，其中一个重要的条件就是培养基的组成和浓度。若在菌体的生长阶段，碳源和氮源过于丰富，生长条件适合，菌体就会大量繁殖菌，使营养成分主要消耗在菌体生长上；而在生物合成阶段营养成分便不足以维持正常的生理代谢和合成的需要，从而导致菌丝过早自溶，使生物合成阶段缩短。在补料工艺未采用之前，工业生产的发酵周期一般只能维持在 2 ~ 5d，并且产量很低，采用补料工艺以后，发酵周期都相应延

长，产品的发酵单位也提高了很多。

因此，补料的原则就在于控制微生物的中间代谢，使之向着有利于产物积累的方向发展。利用中间补料的措施对生产菌的生长条件进行适当调节，使其在生物合成阶段具有足够而又不过剩的养料供给，以满足其产物合成和正常新陈代谢的需要。所补加的物料可以是单一的营养物，也可以是多种营养物。

3. 补料的控制措施 在分批补料培养中，营养物的补入速率不一定是恒速的，根据不同的目的要求，它可以被设计成多种方式，诸如周期补料、恒速补料、线性补料、指数补料及对数补料等，以及它们的不同组合。周期补料，又称间断补料，即每隔一定时间补入一次料；恒速补料，是指以一定的速度连续补料；线性补料、指数补料及对数补料则是指补料速度分别随时间呈线性、指数或对数关系递增。采用这种变速补料的意图，旨在使营养物的补入能够恰到好处，与发酵各时间的不同需求相配合，以便收到良好的效果。具体的补料时间及补料量可以将实验所得数据代入上述控制理论方程式，并对其进行解析。

1）补糖的控制：在确定补料的内容后，选择适当的补料时间是相当重要的。补料的时间过早或过晚对发酵过程都是不利的。例如，利用面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）WSH－J701 进行发酵法生产谷胱甘肽（GSH），在发酵进行 4h 后开始补糖，最终的细胞浓度和胞内 GSH 分别达到 $8.78g \cdot L^{-1}$和 $13.6mg \cdot L^{-1}$，发酵液内 GSH 总量达到 $119.4mg \cdot L^{-1}$，细胞对糖转化率达到 $0.335g \cdot g^{-1}$。各项指标较在此之前或之后进行补料的发酵过程均有显著提高。可见，补糖时机对发酵的产量有很大影响。过早补糖，会刺激菌体的生长，从而加速糖的利用，在相同的糖耗速率下，产物的产量明显低于加糖时间适当的批次。

补糖的时机不能单纯以培养时间作为依据，还要根据基础培养基的碳源种类、用量和消耗速度，前期发酵条件，菌种特性和种子质量等因素来判断。因此，根据代谢变化如残糖含量、pH、菌丝形态来考虑，比较切合实际。

在确定补糖开始时间后，补糖的方式和控制指标也有讲究。补糖方法控制不好，难以收到应有的效果。如在谷胱甘肽（GSH）的发酵过程中，当初始的糖浓度低于 $12g \cdot L^{-1}$时，细胞在持续增长的同时可以长时间保持较高的 GSH 合成能力。但是，只要总糖浓度大于 $25g \cdot L^{-1}$，不管是否补糖，GSH 的产量都将有所下降。

补糖的方式一般都以间歇定时加入为主，但近年来也开始注意用定时连续滴加的方式进行补料。连续滴加比分批加入的控制效果好，可以避免由于一次性大量加入而引起菌体代谢受到环境突然改变的影响。当一次性补料过多时，会出现发酵产物的产量在十几小时以内都不增加的现象，其原因可能在于菌体对环境的突然变化有一个更新适应的过程。这种突然改变有时还有可能导致合成方向的改变，使发酵液中的产物积累量受到影响。为了便于连续滴加，有的发酵工厂采用简单的滴加装置，可以计算滴加速率和加入的总量。

除了用还原糖作为控制指标以外，还可用总糖作为控制指标。如在土霉素的补料分批发酵过程中，总糖的补料原则为：前期少量多次，控制总糖 5% ~6%；中期保持半饥饿状态，残糖控制在 4% ~5%；后期残糖在 3% ~4%；放罐在 2% 左右。

在有些发酵过程的控制中，还需参考糖的消耗速度、pH 变化、菌丝发育情况、发酵液黏度、发酵罐的实用体积等参数。

2）补充氮源及无机盐：流加氨水是某些发酵生产补料工艺中的有效措施，它起着补充菌体生产所需无机氮源和调节 pH 的双重作用。流加氨水时要做到缓慢加入，并注意泡沫的

产生情况。为了避免一次加入过多而造成局部碱性过大的现象，也有把氨水管道接到空气分流管内，借着气流的进入而带入，从而可与培养液进行迅速混合。

有些工厂根据发酵代谢的具体情况，中间添加某些具有调节生长代谢作用的物料，如磷酸盐、尿素、硝酸盐、硫酸钠、酵母粉或玉米浆等。如果有生长迟缓、耗糖低的情况出现，则可补充适量的磷酸盐，以促进糖的利用，但需注意培养时间和空气流量间的相互配合。如在土霉素发酵前期补 2 ~3 次酵母粉，可使发酵罐中的产物得率比对照组高出 1500μ · ml^{-1}。另外，当青霉素发酵不正常，菌丝展不开，而形成葫芦状时，糖耗速度缓慢，这时添加尿素水溶液会带来一定的好处。

总之，补料操作是灵活控制中间代谢的有效措施。补料的控制方法应依微生物种类、菌种和培养条件的不同而有所差异，不能照搬套用。在实际应用过程中，应根据具体情况，通过实践确定出最适合的中间控制方法。

补料操作中应注意以下几个问题：料液配比要适合，浓度过高不利于料液的消毒及输送；过低，则会引起料液体积增大，从而带来一系列问题，如发酵单位稀释、液面上升、加消泡剂量增加等。由于经常性添加物料，应注意加强无菌控制，对设备和操作都必需从严管理；此外，应考虑经济核算，节约粮食，注意培养基的碳氮平衡等。

4. 补料分批培养计算机控制系统　补料分批培养技术的应用几乎遍及整个发酵工业，如生产酵母、氨基酸、抗生素、酶制剂、有机酸、溶剂、维生素等。培养过程的自动化是该技术应用于工业生产的必经之路。目前，人们对这一过程的自动化控制已有一定程度的研究、开发与利用。

8.5　废水生物处理工艺

由于有机成分在生活污水和工业废水中占极大的比重，因此，基于自然界中生物自净作用发展起来的废水生物处理技术在处理各类有机废水（化工废水、洗涤剂废水、柠檬酸生产废水、生物制药废水、啤酒废水等）中得到日益广泛的应用。废水生物处理是一种在生物反应器水平上模拟水体自净作用的强化过程。其基本原理是利用微生物分解有机物，同时合成自身细胞（即活性污泥）的过程。从生物工程角度来说，它是目前规模最大的工业化发酵工程。通过废水处理，能够絮凝和去除废水中不可自然沉淀的胶体状固体物，稳定和去除废水中的有机物，去除营养元素氮和磷。

生物处理法在废水处理技术方面将起到越来越重要的作用，主要体现在以下几个方面：①城市污水中约有 60% 以上的有机物用生物法去除最经济；②废水中氮的去除一般来说只有依靠生物法；③目前世界上已建成的城市污水处理厂有 90% 以上采用生物处理法；④大多数工业废水处理厂也是以生物法为主体的。基于生物反应过程在废水处理过程中的重要作用，本小节将简要介绍两种重要的废水生物处理工艺，即序批式活性污泥法（sequencing batch reactor activated sludge process，SBR）和升流式厌氧污泥床（upflow anaerobic sludge blanket，UASB）处理工艺。

8.5.1　SBR 生物反应过程

SBR 是一种间歇运行的污水生物处理工艺，实际上并不是一种新技术。1914 年，由于发现了将空气吹入污水中能获得好的处理效果而发明了活性污泥法，当时采用的就是间歇式

反应器。由于当时的曝气器、排水装置和监控技术都不适当，在20世纪20年代后，它几乎被连续式活性污泥处理系统（continuous flow activated sludge system，CFS）所取代。

但是，连续系统和间歇系统相比，有一些自身难以克服的缺点：如缺少水质水量发生变化时的运行灵活性；固液分离不是在相对静止的条件下进行；容易出现污泥膨胀现象；需要设置沉淀池和污泥回流池。随着近代工业的发展，产生了一大批新型的监测控制设备，克服了SBR工艺操作繁琐、曝气头易堵塞等缺点，排除了实际应用中的最大障碍。因此，近二十年来，SBR工艺受到了国内外的广泛重视。

自20世纪70年代起，美国Natra Dame大学的Irvine等人在实验室内对SBR法的基本运行特性做了研究，在美国环保署的支持下，于1980年把印第安纳州南部的Culver城市污水厂改建成SBR系统，得到令人鼓舞的结果，引起了各国对SBR污水处理工艺的注意。我国自1985年建成首座处理肉类加工污水的SBR系统后，又陆续在城市污水、鱼加工、家禽加工、肉类加工污水、制药污水和生活污水等处理工程中建造了SBR系统。澳大利亚是最早开发和最多应用SBR法的国家之一，该国的BHP公司声称拥有世界上最先进的SBR法生物除磷脱氮工艺。目前已建成SBR法污水处理厂600座，处理量最大的厂为$2.1\times10^5 m^3/d$。美国最大厂为$1.1\times10^5 m^3/d$的处理规模。SBR法具有以下特点：①对水量、水质变化的适应性强，运行操作灵活；②有机质的去除可近似地认为与浓度呈一级反应；③可以实现硝化和反硝化；④能有效地实现生物除磷。SBR法的一般流程如图8-39所示。

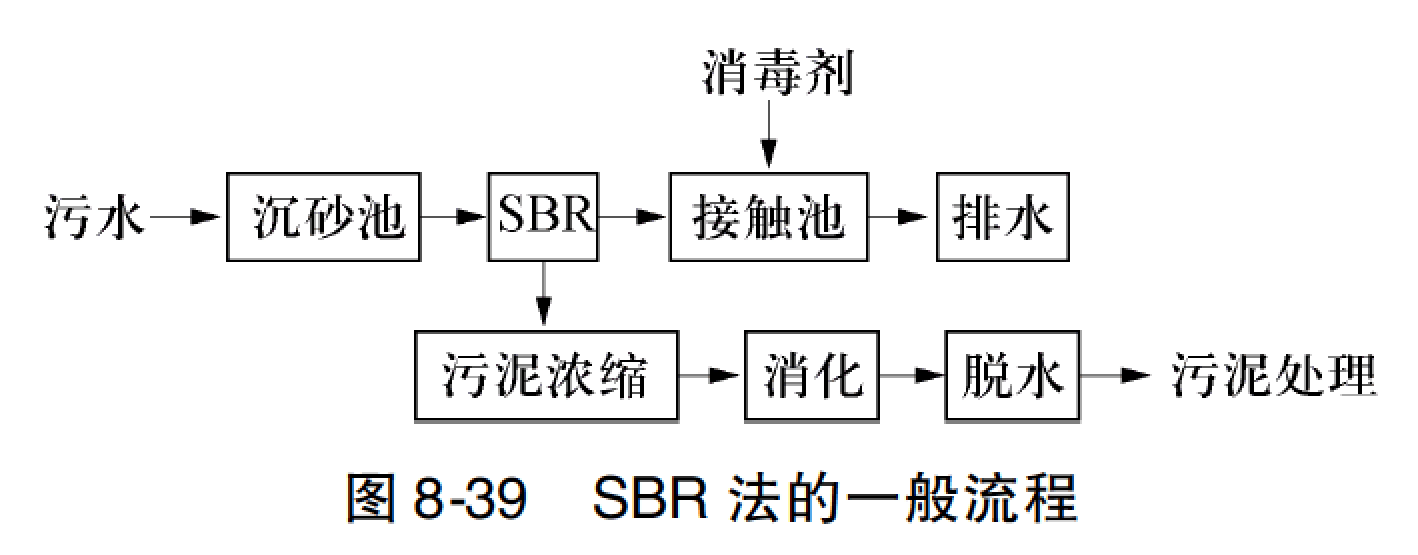


图8-39 SBR法的一般流程

在SBR系统中，污泥容积指数（sludge volume index，SVI）低，且活性污泥菌胶团密实，通常不发生丝状菌膨胀现象。这是因为在SBR系统中存在着有机质浓度梯度。另外，在进水期，系统中的有机质浓度高，有利于菌胶团的生长，耐低基质浓度的丝状菌的生长则处于竞争劣势。

SBR法运行中的产泥量也较少。在SBR系统的运行初期，反应池内剩余溶解氧浓度很低，根据Monod方程式，利用游离氧作为最终电子受体的污泥产率与剩余溶解氧浓度有关：

$$Y_{O_2} \propto \frac{c_{O_2}}{c_{O_2} + K_{O_2}} \tag{8-237}$$

式中：Y_{O_2}为利用游离氧作为最终电子受体时的污泥产率（$mg\cdot L^{-1}\cdot h^{-1}$）；$K_{O_2}$为溶解氧饱和系数（$mg\cdot L^{-1}$）；$c_{O_2}$为剩余溶解氧浓度（$mg\cdot L^{-1}$）。

若K_{O_2}以$0.25mg\cdot L^{-1}$计，则当c_{O_2}小于$0.5mg\cdot L^{-1}$时，污泥产率比c_{O_2}大于$2mg\cdot L^{-1}$时，至少要低25%。另外，当SBR系统中硝酸盐还原菌利用NO_3^-作为最终电子受体进行无氧呼吸时，由于NO_2^-/NO_3^-的氧化还原电位较$H_2O/0.5O_2$的高，因此，电子通过电子传递链产生的ATP数量少，污泥产率低。

8.5.2 UASB生物反应过程

UASB反应器是荷兰学者Lettinga等人在20世纪70年代初开发的。图8-40为UASB反

应器工作原理示意图。图 8-41 为 UASB 反应器的工作状态模型。

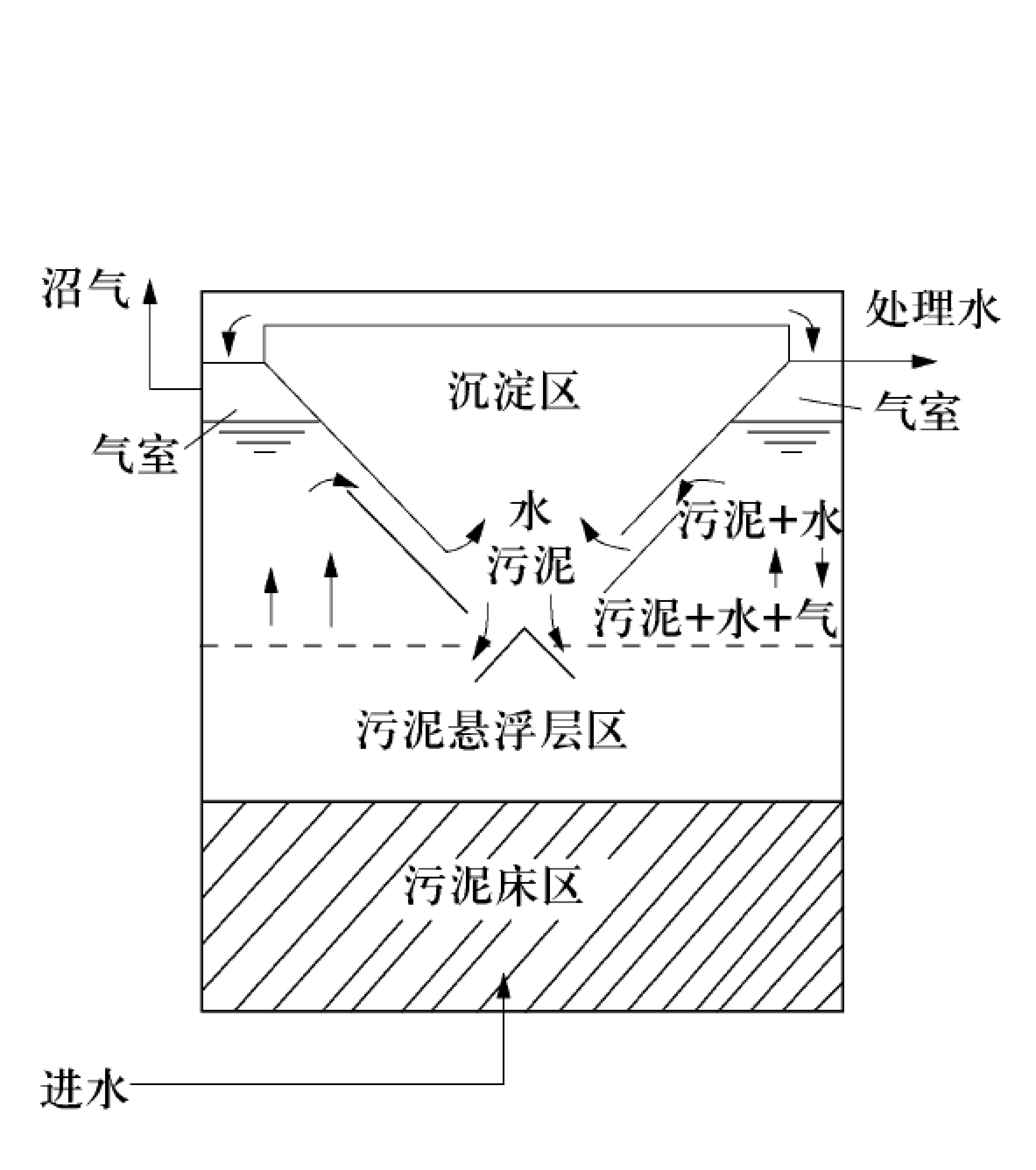



图 8-40　UASB 反应器工作原理示意图

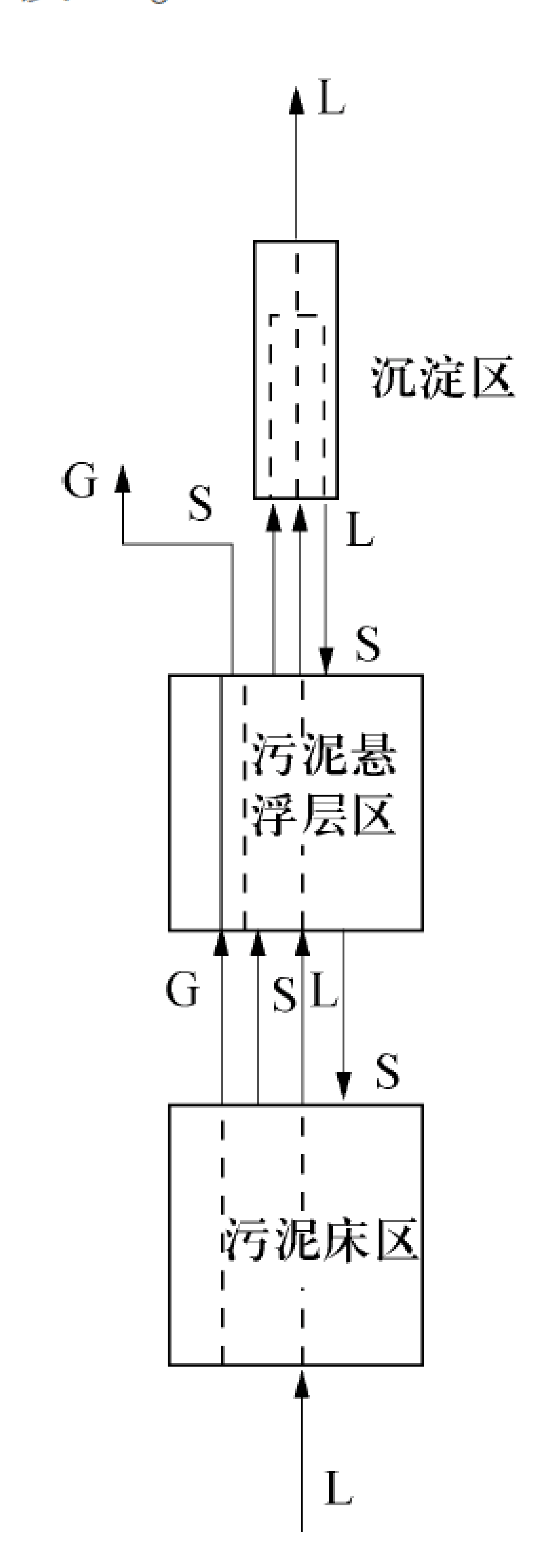


图 8-41　UASB 反应器的工作状态模型

L：液体；G：气体；S：固体

UASB 反应器由反应区和沉降区两部分组成。反应区又可根据污泥的情况分为污泥悬浮层区和污泥床区。污泥床主要由沉降性能良好的厌氧污泥组成，浓度可达 50 ~ 100g（SS）$\cdot L^{-1}$或更高。污泥悬浮层主要靠反应过程中产生的气体的上升搅拌作用形成，污泥浓度较低，一般为 5 ~ 40g（SS）$\cdot L^{-1}$。在反应器上部设有气（沼气）、固（污泥）、液（废水）三相分离器，分离器首先使生成的沼气气泡上升过程受偏折，然后穿过水层进入气室，由导管排出反应器。脱气后的混合液在沉降区进一步进行固、液分离，沉降下的污泥返回反应区，使反应区内积累大量的微生物。待处理的废水由底部水系统进入，澄清后的处理水从沉淀区溢流排出。由于在 UASB 反应器中能够培养得到一种具有良好沉降性能和高产甲烷比活性的颗粒厌氧污泥（granular anaerobic sludge），因而相对于其他同类装置，颗粒污泥 UASB 反应器具有一定的优势：

① 有机负荷居第二代反应器之首，水力负荷能满足要求。

② 污泥颗粒化后使反应器对不利条件的抗性增强。

③ 将污泥或流出液的人工回流的机械搅拌维持在最低限度，甚至可完全取消，尤其是颗粒污泥 UASB 反应器，由于颗粒污泥的体积质量比人工载体小，在一定的水力负荷下，可以靠反应器内产生的气体来实现污泥与基质的充分接触。因此，UASB 可省去搅拌和回流污泥所需的设备和能耗。

④ 在反应器上部设置的气 – 固 – 液三相分离器，使沉降良好的污泥或颗粒污泥避免了附设沉淀分离装置、辅助脱气装置和回流污泥设备，简化了工艺，节约了投资和运行费用。

⑤ 在反应器内不需投加填料和载体，提高了容积利用率，避免了堵塞问题。正因如此，UASB 反应器已成为第二代厌氧处理反应器中发展最为迅速、应用最为广泛的装置。目前 UASB 反应器不仅用于处理高、中等浓度的有机废水，也开始用于处理如城市废水这样的低

浓度有机废水。

厌氧反应器的启动是废水厌氧生物处理过程中一个重要过程。UASB 反应器的启动可分为两个阶段：第一阶段是接种污泥在适宜的驯化过程中获得一个合理分布的微生物群体；第二阶段是这种合理分布的微生物群体的大量生长、繁殖。可见启动过程对发挥反应器的效能具有重要的意义。

（1） UASB 反应器的初次启动：初次启动通常指对一个新建的 UASB 系统以未经驯化的非颗粒污泥（如污水处理厂消化池的消化污泥）接种，使反应器达到设计负荷和有机物去除效率的过程。有时候这一过程伴随着颗粒化的完成，因此也称为污泥的颗粒化。由于厌氧微生物，特别是甲烷菌增殖很慢，厌氧反应器的启动需要较长的时间，因此启动慢被认为是高速厌氧反应器的一个不足之处。但是，一旦启动完成，停止运行后的再次启动可以迅速完成。

结合近年来有关 UASB 初次启动操作的经验，有研究者进一步总结出如下注意事项：

① 应明确启动初期的目标。初期的目标是使反应器进入工作状态，也即菌种的活化过程，因而不能有较大的负荷，启动开始时污泥负荷应低于 0.1 ~ 0.2kg （COD） $\cdot$ kg^{-1} （TSS） $\cdot$ d^{-1}。

② 进水的浓度。当废水浓度低于 5000mg （COD） $\cdot$ L^{-1}时，一般可直接进液；当废水浓度过高时，最好稀释到 5000mg （COD） $\cdot$ L^{-1}以下。

③ 采用负荷逐步增加的操作方法，可通过增大或降低进液稀释比的方法进行。启动时乙酸浓度应控制在 1000mg $\cdot$ L^{-1}以下，若废水中原有的或在发酵过程中产生的各种挥发性有机酸浓度高时，不应提高有机容积负荷率。只有当可降解的 COD 去除率达到 80% 左右时，才能逐渐增加有机物容积负荷率。

④ 启动前应了解废水的特征。废水特征对厌氧反应器的操作有重要影响，因此必须明确了解废水的有机物浓度、pH 缓冲能力（酸碱度）、维持细菌生长所必需的营养、悬浮物含量及废水中的有毒化合物等。启动过程中，悬浮物浓度控制在 2g $\cdot$ L^{-1}以下。试验证明，用未经酸化的废水作进水，污泥颗粒化的速度要比以挥发性脂肪酸（VFA）含量高的废水作进水时快。对于可生化性较差的废水，启动中加入易生化物质是有益的。如北京市环保所处理醋酸生产废水和苯二甲酸生产废水时，分别添加了生活污水和淀粉，对 UASB 反应器的启动起到很好的加速作用。出水 VFA 浓度与容积有机负荷率对污泥颗粒化具有一定的影响。

（2） UASB 反应器的二次启动：如果采用的接种污泥来自处理废水种类与新启动的反应器所要处理的废水相同或性质非常接近的装置，这时候的启动常常成为反应器的二次启动。也有人认为二次启动包括初次启动完成后的反应器由于某些原因停止操作一段时间后的再次启动。颗粒污泥是 UASB 启动理想的接种污泥，用颗粒污泥作为接种污泥来启动 UASB 也称为二次启动。由于二次启动过程中污泥驯化的时间要求短，因而可以显著缩短启动时间。二次启动的初始反应器负荷可以较高，进液浓度在开始时一般可与初次启动相当，但可以相对迅速地增大进液浓度，负荷与浓度增加的模式与初次启动类似，但相对容易。产气、出水 VFA 等仍是重要的控制参数，COD 去除率、pH 等也是重要的监测指标。

本章小结

生物反应过程的设计与优化是生物反应工程的中心问题。本章首先阐述了生物反应过程（分批反应过程、连续反应过程和流加反应过程）的动力学特点和操作特性，在此基础上进

一步讨论了如何进行相应的生化反应器的设计，最后阐述了生化反应过程的优化与控制问题。

参考文献

陈坚. 2001. 环境生物技术应用与发展. 北京：中国轻工业出版社
黄世文，王玲，王全永. 2007. 工、农业发酵废水生物处理及应用研究进展，23：70～75
李寅. 2006. 高细胞密度发酵技术. 北京：化学工业出版社
倪雪朋，熊三玉，管斌，等. 2008. 利用流加发酵进行耐氧两歧双歧杆菌高密度培养的研究. 中国食品添加剂，3：411～415
戚以政. 2004. 生物反应工程. 北京：化学工业出版社
任翱. 2000. 废水生物处理技术及其研究进展. 环境科学动态，4：19～24
任小玲，周迟骏. 2004. 废水生物处理技术发展浅谈. 化工时刊，18：32～34
王岁楼. 2002. 生化工程. 北京：中国医药科技出版社
温少红. 2001. 细胞反应过程模型及计算机模拟. 济南：济南出版社
叶勤. 2005. 发酵过程原理. 北京：化学工业出版社
张艳军，张晓云，李志敏，叶勤. 2008. 大肠杆菌及其耐乙酸突变菌的连续培养和代谢流比较. 化工学报，59：160～166
张元兴. 2001. 生物反应器工程. 上海：华东理工大学出版社
张云，胡洪波，彭华松，等. 2007. 产 PCA 基因工程菌 M18G 反复补料分批培养研究. 工业微生物，37：16～20
Haifeng Hang，Xinhao Ye，Meijin Guo，et al. 2009. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. Enzyme Microbial Technol，44：185～188
Haiyi Zhang，Yu Zheng，Qinghai Liu，et al. 2009. Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TAT_m-survivin（T34A）in *Escherichia coli*. Biochem Eng J，43：163～169

习　题

1. 生物反应过程设计的原则是什么？
2. 按操作方式区分，生物反应过程有哪几种？其主要操作特点是什么？
3. 生物反应过程的选择依据是什么？
4. 实现高密度细胞培养的策略主要有哪些？
5. 在一间歇操作的搅拌反应器中进行脲酶催化尿素分解为氨和 CO_2 的反应，要求底物的转化率为 0.8。底物的初始浓度为 $0.1mol \cdot L^{-1}$，反应器中酶浓度为 $0.001g \cdot L^{-1}$。在等温反应条件下的动力学常数 K_m 为 $0.0266mol \cdot L^{-1}$，最大反应速率为 $1.33mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$，相应此最大反应速率的酶浓度约为 $5g \cdot L^{-1}$。求完成反应所需的时间。
6. 在甘露醇中混合培养大肠杆菌，其动力学方程为

$$r_X = \frac{1.2c_S}{2 + c_S}c_X \ (g \cdot L^{-1} \cdot min^{-1})$$

已知 $c_{S_0}=6g\cdot L^{-1}$，$Y_{X/S}=0.1$，试求：

当甘露醇溶液以 1L · min^{-1}的流量进入体积为 5L 的 CSTR 中进行反应时，其反应器内细胞的浓度及其生长速率为多少？

如果要求大肠杆菌在 CSTR 内的生长速率达到最大，最佳的加料速率应为多大？

7. 在一个 5m^3 CSTR 中进行连续发酵，加料中底物浓度为 20kg · m^{-3}，该反应的有关参数为：$\mu_{max}=0.45h^{-1}$，$K_S=0.8kg\cdot m^{-3}$，$Y_{X/S}=0.55$。试求：

（1）当底物达到 90% 转化时，所要求的加料速率是多少？

（2）如果要求其细胞产率达到最大，加料速率应为多少？细胞最大产率是多少？

8. 某一微生物反应，其速率方程为：

$$r_X = \frac{2c_Sc_X}{1+c_S}\ (g\cdot m^{-3}\cdot h^{-1})$$

现已知 $c_{S_0}=3g\cdot m^{-3}$，$c_{X_0}=0$，$Y_{X/S}=0.5$，$V_R=1m^3$。若该反应在 CSTR 反应器中进行，试求：

（1）该反应的最佳加料速率应为多少？此时反应器出口 $c_{X,opt}$、$c_{S,opt}$、$(P_X)_{max}$ 各为多少？

（2）当加料速率为 $\frac{1}{3}$ m^3 · h^{-1}时，c_X、c_S、P_X 又为多少？

9. 某微生物反应的动力学方程为：

$$r_X = \frac{2c_Sc_X}{1+c_S}\ (g\cdot L^{-1}\cdot\ min^{-1})$$

已知 $c_{X_0}=c_{P_0}=0$，$c_{S_0}=3g\cdot L^{-1}$，$Y_{X/S}=0.5$。

试求：

（1）在单一 CSTR 中，$V_R=1L$，$V_0=1L\cdot min^{-1}$，求出口 c_S等于多少？

（2）在同一 CSTR 中，如果 $V_0=1L\cdot min^{-1}$，求出口 c_S等于多少？

（3）如果在 $V_0=3\ L\cdot min^{-1}$下操作，得到出口 $c_S=1/3g\cdot L^{-1}$，则其 CSTR 的体积 V_R是多少？

10. 某一均相酶反应在 CSTR 中进行，其动力学方程为：

$$r_S = \frac{0.1c_S}{1+0.5c_S}\ (mol\cdot L^{-1}\cdot\ min^{-1})$$

若进料流量为 25L · min^{-1}，反应底物 S 在反应器出口已转化了 95%，底物初始浓度为 2mol · L^{-1}时，所需反应器体积为多大？

第 9 章　重组微生物反应工程

【重要概念】

重组微生物、基因工程、代谢工程、质粒稳定性、异源蛋白表达、细胞代谢产物、抗逆性、细胞培养工程

引言

微生物在长期进化中获得了各式各样的生长代谢方式，在生物质资源利用方面具有不可比拟的优势。它们可以分解利用生物质的几乎所有组分，并将其转化为各种化学品，包括重要的化工原料（如乙烯、乳酸、丙烯酰胺等）、能源产品（如生物氢、生物乙醇、生物柴油等）和高分子功能材料（如聚羟基烷酸酯）等。在能源、资源短缺制约全世界经济的可持续发展、影响各国国家安全的严峻形势下，以微生物为主体的工业生物技术是降低对化石资源的依赖、增加品种、提高品质和清洁生产、实现可持续发展的有效途径，成为生产大宗或精细化学品、健康食品和医药产品、新材料和能源产品等的“新型工业制造技术”。

微生物种类繁多。按结构不同，可以分为原核细胞型（如细菌、放线菌、支原体等）、真核细胞型（如酵母菌、霉菌等）和非细胞型（如病毒等）。其中，细菌、放线菌、酵母菌和霉菌是最主要的几类工业微生物。

另一方面，按是否经过基因工程改造，微生物又可以分为两大类：天然（野生）微生物和基因重组微生物（简称重组微生物）。随着工业生物技术的发展，一方面越来越多的野生新菌株被鉴定和开发出来；另一方面，也有越来越多的野生菌株经过基因工程和代谢工程方法改造，成为性能更加优良的重组微生物。近年来，随着基因工程和代谢工程等学科与方法的发展（表 9-1），基因重组微生物的构建和开发越来越高效，重组微生物的性能提升也越来越显著，使得重组微生物的实践应用越来越广泛和深入，逐渐发展成为工业生物技术的主导。

表 9-1　基因工程相关的重要概念或方法的发展

时间	关键技术或概念
1833 年	酶的发现：法国化学家 Payen、Persoz 从麦芽水抽提物中得到一种对热不稳定的活性物质，可促进淀粉水解成可溶性的糖
1866 年	遗传因子的发现：孟德尔的豌豆杂交试验——现代遗传学的开端
1896 年	酶学研究的开始：德国 Buchner 兄弟用石英砂磨碎的酵母细胞或无细胞滤液能和酵母细胞一样将 1 分子葡萄糖转化成 2 分子乙醇和 2 分子 CO_2——酒化酶（zymase）

续表

时间	关键技术或概念
1909 年	“基因”的命名：丹麦 W. Johannsen 提出基因（gene）的概念，意为给予生命
20 世纪初	基因论：美国遗传学家摩尔根（Thomas Hunt Morgan）通过果蝇杂交实验证明基因是染色体的一部分
1917 年	Karl Ereky 提出“生物技术”这一名词
1944 年	DNA 是遗传物质和基因的载体：艾弗瑞（O. Avery）的肺炎双球菌转化实验
1953 年	J. Waltson 和 F. Crick 发现 DNA 双螺旋结构
20 世纪 60 年代	遗传密码子的解析；基因具有不同的功能
1967 年	DNA 连接酶的发现
1970 年	限制性内切酶的发现
1973 年	基因工程的开端：加州大学旧金山分校进行了最初的 DNA 重组实验（S. Cohen, H. Boyer 等）——将基因从一种生物转移到另一种生物
1975—1979 年	DNA 序列测定：双脱氧法和化学分解法（F. Sanger）；DNA 印迹法（Southern Blotting）；蛋白质印迹法（Western Blotting）；Genentech 公司用大肠杆菌生产出人胰岛素
1980—1983 年	大肠杆菌转化方法的改进（氯化钙法制备感受态细胞的改良）
1982 年	电转化法（electroporation）的发展：细胞内高效导入 DNA
1985 年	美国 PE – cetus 公司 Kary mullis 发明聚合酶链式反应（PCR）扩增基因的方法
1988 年	耐热 DNA 聚合酶 PCR 的应用
1990 年	正式启动人类基因组计划；美国开始使用重组凝乳酶生产奶酪
1991 年	代谢工程的提出：应用 DNA 重组技术对细胞的酶运输及调节功能进行有目的修饰（J. E. Bailey）；或对生化反应的代谢网络进行有目的修饰，最终改变代谢流，提高目的产物的产率的理性化方法（G. Stephanopoulos）
1996 年	完成真核生物酿酒酵母染色体 DNA 的测序
1997—1999 年	克隆羊的出现；FDA 批准反义药物和重组融合蛋白用于疾病治疗
2000—2010 年	拟南芥基因组测序；单克隆抗体高速发展；人类基因组测序完成；人类基因微阵列（基因芯片）上市；各种生物技术蓬勃发展

重组微生物的反应工程是重组微生物应用于生产实践的核心，它涵盖了重组微生物的构建和改造、细胞培养、蛋白质表达、产物积累和提取纯化等各方面的内容。与此相应，重组微生物反应工程的前沿研究近年来也取得了突破性的进展。比如，2006 年获得美国总统绿色化学挑战奖中绿色反应条件奖（Greener Reaction Conditions Award）的立普妥（lipitor）酶法转化工艺。立普妥是世界上最畅销的降低胆固醇药物，也是世界上第一个年销售额超过 100 亿美元的药物。Codexis 公司使用基因切削方法，发明了一种基于重组的酶法生产过程，更快速、高效、安全、清洁地生产立普妥的活性成分——阿托伐他汀钙的重要手性中间体——乙基（R）4-氰-3-羟丁酸（称为羟腈 hydroxynitrile，HN）。通过 3 种重组酶的 2 步耦合催化，HN 合成的氢化还原反应的容积产率提高了近 100 倍，氰化反应的容积产率提高了近 4000 倍。此外，全世界各国政府、研究小组和跨国公司都在致力于可再生的五碳糖和纤维素利用技术研究；可生物降解材料（聚乳酸或聚羟基烷酸酯）的生物法合成路线研究；重组微生

物细胞工厂生产 1，3-丙二醇、3-羟基丙酸等化学品以及各种氨基酸、有机酸、抗生素和医药产品的新方法研究，以及基因重组微生物合成生物乙醇、生物丁醇、生物制氢、生物柴油等生物能源产品的关键技术研究等。随着石油的日益枯竭，世界各国的经济结构都将会从基于不可再生的“碳氢化合物”为能源和原材料的经济结构，向基于可再生的“碳水化合物”的经济结构的转变。作为“细胞工厂”的微生物，尤其是重组微生物，由于其强大和多样化的代谢能力成为构筑可持续发展经济结构最重要的战略资源和技术源泉。

9.1　重组微生物的构建——基因工程与代谢工程

重组微生物主要通过基因工程和代谢工程方法构建。

按照用途不同，获得的重组微生物可以分为两类：一类用于目的蛋白质的生产，包括用作医药的生理活性蛋白质以及用作生物催化剂的蛋白酶，这通常通过基因突变、过表达、外源表达、大规模生产等经典基因工程方法（重组 DNA 技术）来实现；另一类用于目的代谢产物的生产，包括强化原有代谢产物的生成或者合成本来没有的物质，这通常通过对一种或多种外源基因进行强化、敲除或外源表达，使得微生物细胞内物质的代谢流发生有益改变的方法来实现。

一般说来，重组 DNA 技术是指将一种生物体（供体）的基因与载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新产物或新性状的 DNA 体外操作程序，也称为分子克隆技术。而基因工程则是指重组 DNA 技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术两大组成部分。上游技术指的是基因重组、克隆和表达的设计与构建（即重组 DNA 技术），而下游技术则涉及基因工程菌或细胞的大规模培养以及基因产物的分离纯化过程。

由于微生物的代谢特性非常复杂，每个细胞内都存在着数千种不同的代谢途径，每个代谢途径都有底物、中间代谢物、产物和催化蛋白酶，所有代谢途径又通过共享代谢物交叉连接在一起，形成一个极为复杂的代谢网络，网络结构还会随着遗传组成的不同或者环境条件的改变而相应发生调节和变化，因此传统的技术手段，包括对个别基因进行改造的经典基因工程技术，都不能保证对微生物整个代谢网络结构和生理功能的准确分析和高效利用。为此，代谢工程（metabolic engineering）逐渐发展起来。

代谢工程是利用基因工程技术或其他物理、化学方法对细胞的代谢途径进行精确的修饰与改造，对细胞内目的产物的代谢流进行扩展、减小、阻断或构建新的代谢途径，从而有目的、有理性地改变微生物原有代谢特性，改进或者构建新的微生物表型，并与微生物基因调控、代谢调控及生化工程相结合，提高目的代谢产物活性或产量，或合成新的代谢产物的工程技术科学。一般而言，代谢工程研究的主要目的是改善细胞性能和性状，其研究对象主要是利用一系列的代谢途径合成小分子或大分子的有机化合物；而基因工程的研究目的则通常是基因的翻译产物，即蛋白质。实际上，由于细胞内纷繁复杂的新陈代谢反应都是由各种酶（蛋白质）的催化来实现的，因此，代谢工程的主要研究方法归根结底是基因工程技术，因此代谢工程也被称为“第三代基因工程”。

按照基因重组方法的不同，重组微生物还可以进一步分为如下两种类型：一类是通过基因工程操作，在宿主细胞内，引入携带外源目的基因的重组载体（通常是质粒载体），进行目的蛋白的表达或目的代谢产物的合成。由于有些质粒载体具有很高的拷贝数，所以目的基

因可以通过载体携带实现高表达，但同时也会产生质粒稳定性问题；另一类则是直接对目的菌株的基因组进行强化、阻断或插入等改造，改变细胞的代谢途径或生理特征，高效合成目的蛋白或生产目的代谢产物。基因组携带的外源基因表达一般遗传稳定性好，但由于拷贝数低，因此，在需要目的基因高表达时可能并不适用。当然，也可以在改造细胞的同时，引入质粒载体进行目的产物的代谢合成。简单而言，一类重组微生物含有外源载体；另一类重组微生物不含外源载体。这里的载体主要是指通用的质粒载体（图 9-1）。

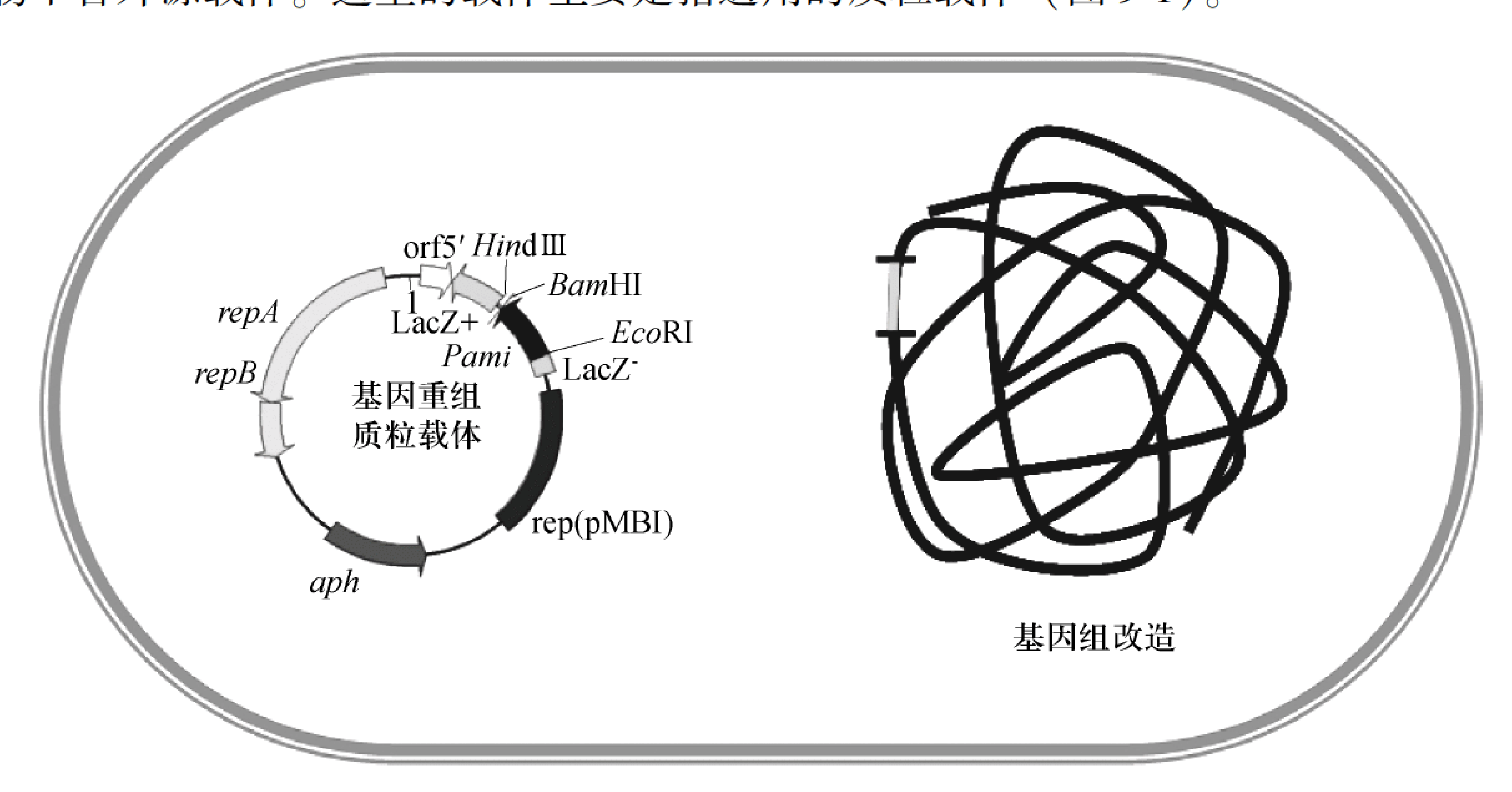


图 9-1　重组微生物的基因重组对象（外源质粒载体和（或）基因组）

对于不含质粒载体的重组微生物，由于没有外源质粒载体的额外引入，虽然重组细胞的表型特征可能发生显著的改变，但是其细胞生长和产物积累过程的反应动力学研究方法均与野生菌株类似。对于含有外源载体的重组微生物，伴随重组质粒载体的引入和外源基因的表达，出现了一系列新的反应动力学特性及研究方法，从而构成了本章的主要内容。

9.2　重组微生物的反应动力学基础

9.2.1　重组微生物的发酵特点

重组微生物的发酵培养是为了获得高浓度的重组细胞，最终获得最大量的基因表达产物。

如上节所述，对于不含质粒载体的重组微生物，尽管其代谢特征和生理功能可能与野生出发菌株相比具有显著不同，但是其发酵培养规律和研究方法却与野生菌株没有太大的区别。然而，对于含有质粒载体的重组微生物，外源质粒载体的引入，会产生一系列的生理效应，从而影响质粒载体的遗传稳定性。由于质粒的不稳定性，工程菌的发酵过程实际上是两种菌的混合物，即含有重组质粒的工程菌和不含重组质粒的宿主菌。通常情况下，不含质粒的宿主菌具有比生长速率优势，一定条件下会逐渐扩增成为发酵过程的主体，继而大大降低质粒载体上携带的外源目的基因的表达量。对于企图利用质粒载体在大型发酵罐中高效表达某种特殊产物（比如重组蛋白）的人们来说，质粒载体的丢失则意味着产量的下降，从而给生产带来严重的后果。因此，质粒载体的不稳定性，一直是重组微生物发酵过程中的一个

既有理论意义又有实际应用价值的重要问题。

此外，由于重组微生物构建方法的需要，重组细胞的质粒载体或基因组中一般都携带某种抗生素抗性标记或其他遗传标记，需要在发酵过程中加以考虑。其中，对于具有某种抗生素抗性的重组微生物，尽管抗生素的加入会减少重组微生物发酵过程中的染菌概率，同时有效地降低质粒的丢失概率，人们在重组微生物的大规模发酵培养过程中仍然会尽量避免使用抗生素，尤其是在药物和食品生产时禁止使用抗生素。这一方面是出于发酵成本的考虑，另一方面，则是环境安全和人类健康的需要，避免微生物耐药性在自然界中的扩散，从而严重威胁人类的身体健康。

再有，对于携带质粒载体的重组微生物，携带的质粒载体有两种不同的类型：一类称为诱导型载体（inducible vector），含有诱导型启动子，需要在发酵培养过程中外加诱导剂才能启动目的基因的高效表达；另一类称为组成型载体（constitutive vector），可以不需诱导剂直接启动目的基因的表达。对于含有诱导型表达载体的重组微生物，其发酵动力学行为受到诱导剂加入时机和加入量的调控，同时受到质粒稳定性和外源基因表达的影响。而对于含有组成型表达载体的重组微生物，其发酵动力学规律主要受质粒稳定性和外源基因表达的影响。

综上所述，含质粒重组微生物的质粒稳定性问题，会直接影响发酵过程中细胞的生长和产物的产量。重组细胞内质粒的丢失将导致菌株性能退化、工程菌含量减少，进而引起目的产物产量严重降低。因此，在重组微生物的大规模培养和实践应用之前，都需要考虑其质粒稳定性问题。

9.2.2　重组微生物的质粒稳定性问题

在形形色色的生命形态中，质粒是一类特别引人注目的亚细胞有机体。它是独立于染色体之外能够进行复制和稳定遗传的共价、闭合、环状的双链 DNA 分子（cccDNA）。它的结构比病毒还要简单，既没有蛋白质外壳，也没有细胞外的生命周期，只能够在寄主细胞内独立地增殖，并随着寄主细胞的分裂而遗传下去。随着生物技术的发展，利用具有不同功能特性的质粒载体来表达外源基因已经成为构建重组微生物的主要方法之一。

通常所说的基因工程菌的质粒不稳定性（plasmid instability），包括分离不稳定性（segregational instability）和结构不稳定性（structural instability）两个方面。前者是指在细胞分裂过程中有一个子细胞没有获得质粒 DNA 拷贝，并最终增殖成为无质粒的优势群体；也可以认为是重组 DNA 分子从受体细胞中的逃逸现象。而后者主要是指由转位作用和重组作用引起的质粒 DNA 的重排与缺失。

DNA 的定点突变、缺失、插入和重排等都是造成质粒载体结构不稳定性的原因。具有同向重复短序列特征，如人工构建的具有多个串联启动子的质粒载体特别容易发生缺失作用。此外，质粒载体位点之间的同源重组、宿主染色体及质粒载体上 IS 因子（insertion sequence element）和转座子（transposon）等转座元件的插入作用、邻位缺失或 DNA 倒位，都有可能使质粒载体产生自发突变，从而导致质粒载体的结构不稳定性。此外，受体细胞的限制修饰系统对外源重组 DNA 分子的降解、外源基因过量表达时能量和物质的匮乏以及表达产物的毒性作用诱导受体细胞产生应激反应——激活核酸酶和蛋白酶对重组 DNA 分子和目的产物的降解，也都会导致质粒分子的结构不稳定性。

质粒的分离不稳定性起因于质粒的缺陷性分配（defective partitioning），也称为不均匀分配。在细胞的复制和分裂过程中，要使质粒能够保持稳定的遗传，至少得满足如下两个条

件：首先，平均而言每个世代每个质粒都必须至少发生一次复制；其次，当细胞分裂时，复制产生的质粒拷贝必须分配到两个子细胞中去。质粒拷贝分配到子细胞中的途径可分成主动分配（active partition）和随机分配（random partition）两种不同的方式。主动分配的机制又可分为平均分配（equipartition）和配对位点分配（pair-site partition）两种。由于主动分配存在着有效的质粒拷贝数控制系统，从而保证了质粒的高度稳定性。质粒的随机分配则与主动分配截然相反，它是指在细胞分裂过程中质粒拷贝数在 2 个子细胞之间的分配是随机的。当含有 n 个质粒分子的细胞进行随机分配时，每个子代细胞将按照正态分布的规律分别遗传 $0 \sim n$ 个质粒，因此，不含质粒的细胞（空载细胞，P^-）就会按一定概率出现。

通常情况下，含质粒细胞（P^+）的生长速率要低于无质粒细胞，这是由于含质粒细胞与无质粒细胞相比要合成更多的 DNA、mRNA 和蛋白质，因此要消耗更多的能量。质粒编码基因还将同宿主染色体编码的基因直接竞争使用前体（如核酸和氨基酸）和催化剂——即 DNA、RNA 和蛋白质合成过程中涉及的各种酶等物质。这种质粒与宿主细胞之间在复制、转录和翻译等各个水平上对前体大分子、能量、酶系乃至核糖体结合位点等进行的激烈竞争通常会导致含质粒重组细胞的生长弱势。

此外，由质粒基因编码的产物蛋白质的毒性以及启动子的强度等也将影响含质粒细胞的生长速率。由于质粒丢失后的细胞不仅不能再合成目的产物，还会同含质粒细胞进行生长竞争，因此在生物反应器中无质粒细胞一旦出现，就会迅速增殖，导致 P^- 与 P^+ 细胞的混合培养，若 P^- 细胞最终增殖成为优势菌群，就会使发酵产物的产率迅速下降，从而造成严重的经济损失。

质粒分离不稳定性的严重程度取决于 2 个参数：无质粒细胞的产生概率和无质粒细胞与含质粒细胞的生长比速率之比（μ^-/μ^+）。无质粒细胞产生得越多，μ^-/μ^+ 值越高，无质粒细胞在整个细胞群体中占据生长优势的所需时间就越短。上述 2 个参数均是细胞群体意义上的宏观参数，它们有时可以与分子水平上的微观参数关联起来。

无质粒细胞产生的概率与质粒的拷贝数高低密切相关。通常所说的质粒拷贝数表征的只是群体意义上的平均值，它并不反映细胞群体中质粒载体拷贝数分布的客观动态。在实际培养过程中，不同细胞个体之间的质粒拷贝数存在一定的差异，差异的程度简称为差度。正是由于拷贝数差度的存在，使得有些细胞内含有少于平均值的质粒拷贝，甚至根本没有质粒拷贝，从而加快了质粒载体的丢失速率，造成了质粒载体的不稳定。无质粒细胞与含质粒细胞的生长比速率（μ^-/μ^+）则同时取决于两种细胞的基因型以及细胞的培养条件。因此，影响质粒稳定性的因素就可以归结为质粒自身因素、宿主因素以及环境因素（主要指培养条件）等三个方面。

9.2.3 影响质粒载体稳定性的因素

如前所述，影响质粒载体稳定性，包括结构稳定性和分离稳定性的因素，可以归结为质粒、宿主及环境因素等三个方面。

1. 质粒因素 构建质粒表达基因工程菌的关键在于携带目的基因的质粒载体。一个理想的质粒载体应具有如下特点：拷贝数高，分子小，具有遗传稳定性和选择性标记，具有几个独特的限制性内切酶作用位点以及易于转入宿主细胞等。

质粒的拷贝数是影响质粒稳定性的一个关键参数。它主要由质粒自身的基因组成所决定，但宿主细胞的生理特性和环境条件也会对其造成强烈的影响。一般条件下，重组蛋白的

产率会随质粒拷贝数的升高而增大；但当拷贝数增大到一定水平后再继续增大时，重组蛋白产率和质粒拷贝数的这一对应关系就会被打破。导致这一现象的可能原因有 2 个：一是在高拷贝数下，影响重组蛋白质合成的限制步骤不再是质粒的基因拷贝，而可能是转录和翻译过程；二是高拷贝的质粒通常都不稳定，这可能是由于拷贝数越高，质粒与宿主细胞的竞争越激烈所造成的。此外，实验温度、培养基的营养组成及培养方式等都会对质粒的拷贝数造成影响，从而间接影响质粒的稳定性（图 9-2）。

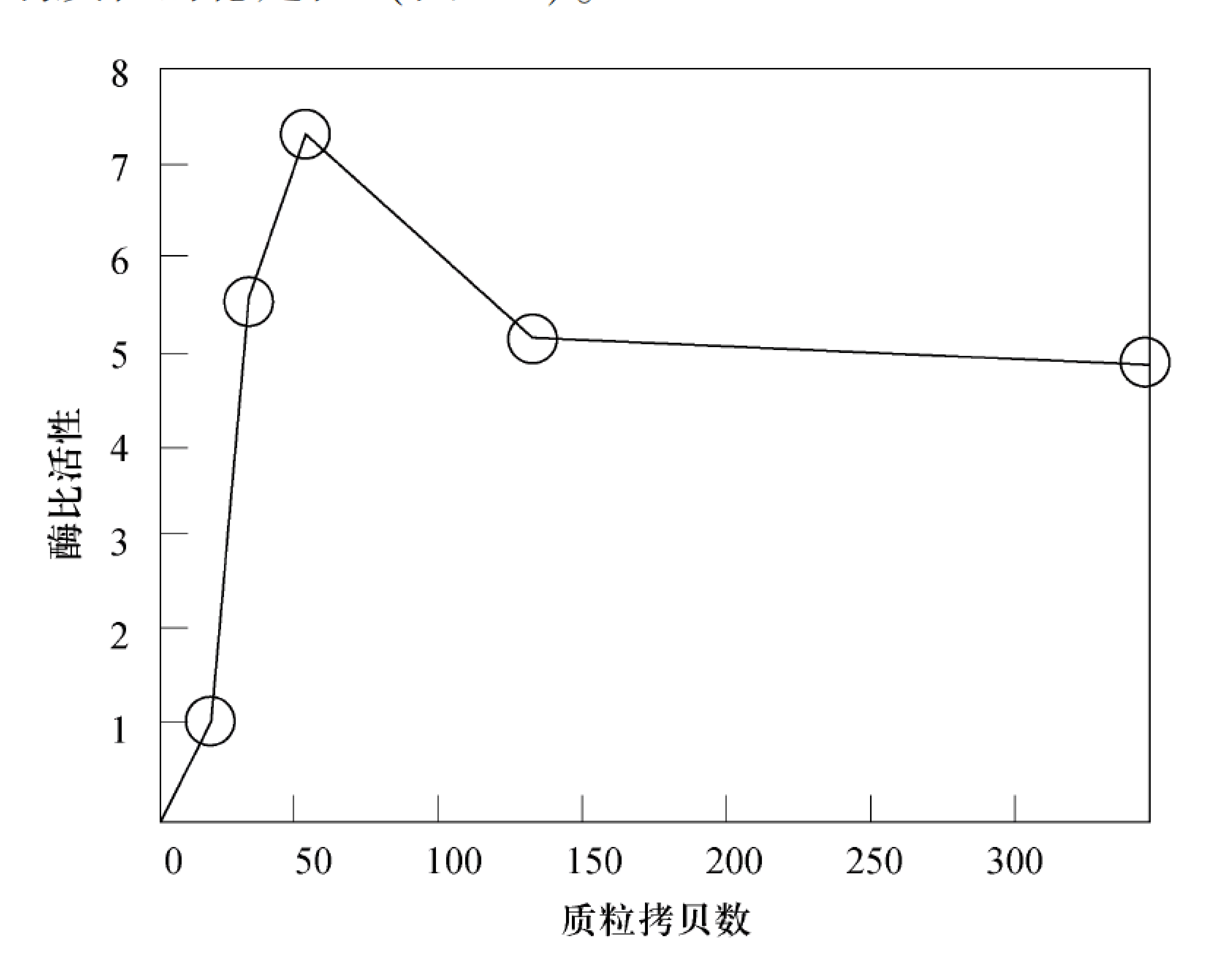


图 9-2　质粒拷贝数和目的蛋白表达的变化趋势图

质粒的可诱导启动子的诱导方式会引起稳定性的差异。*E. coli* TG1 在表达 β-半乳糖苷酶时，用化学诱导启动 *LacZ* 基因比用温度诱导启动时的稳定性高。质粒载体上插入 DNA 分子的大小和引入外源 DNA 的方法都影响质粒的遗传稳定性：当插入 DNA 小于 2kb 时，对质粒稳定性的影响不大；但达到 8kb 时就会产生一定的影响；当大于 21kb 时则会导致质粒的迅速丢失。质粒载体上的某些序列会导致质粒的不稳定性。pBR322 的 tet 衍生质粒上的 tet 启动子丢失时，质粒的稳定性反而提高。

非正常的重组也是导致质粒在复制中出现突变的原因之一。当革兰阳性菌用小于 10kb 的质粒作载体时，质粒是滚环复制的。在复制过程中容易产生单链 DNA（ssDNA）质粒，继续复制时就会出现序列错误；而当采用大于 10kb 的大质粒作载体时，这种错误就可以基本避免，质粒可以在细胞内稳定保存大于 150 代而不丢失。

在重组大肠杆菌中，对于那些含有大相对分子质量插入片段的克隆载体来说，还共同存在着一个普遍问题，就是质粒载体的寡聚化。发生广泛寡聚化效应的细胞内，经常出现大量的质粒二聚体、三聚体甚至四聚体形式的质粒分子，因此很不稳定。

2. 宿主因素　质粒的复制和外源基因的表达均由宿主来提供原料和能量，因此质粒与宿主细胞之间存在着强烈的相互作用，当宿主中质粒复制所必须的某种条件丧失时，就会引起质粒的丢失。

从宿主生理学的角度来看，使用可控启动子有利于质粒的稳定性。携带可控启动子的质粒可以控制在生长阶段少量合成基因产物，从而削弱或消除由于克隆基因或毒性基因大量表达对宿主细胞造成的影响。

通常情况下，具有结构不稳定性的质粒较难识别，这是由于某段基因的少量重排一般并不会导致质粒选择性标记的失活。因此尽管质粒的结构不稳定性发生的频率很低，它仍然应当引起人们的重视。已经有研究表明，当以 JM103 为宿主时，培养过程中 *xylE* 基因的表达将比初始质粒降低 5 ~7 倍。到目前为止，消除质粒的结构不稳定性的可用策略就是选用重组缺陷（rec^-）菌株作为宿主菌。

研究表明，当 *Saccharomyces cerevisiae* 宿主菌株具有与质粒基因互补的重组突变时，质粒的稳定性会大大提高。

3. 环境因素 最适的环境条件是一个成功的生物过程的重要因素，但对重组菌株而言，还往往需要考虑另一个因素，即质粒的稳定性。高质粒稳定性同高产率、高得率和低成本、低消耗一样，都是利用重组菌株进行生物生产的根本目的。

营养限制对质粒稳定性的影响非常复杂，它同时依赖于质粒和宿主菌株。一般来讲，营养限制会对 P^+ 菌的生长带来更大的压力，从而使 P^-/P^+ 菌比值加大（P^- 为单位体积菌液中的无质粒细胞数，P^+ 为单位体积菌液中的含质粒细胞数）。对重组 *E. coli* 的分批培养表明，含质粒 RP1 的细胞比无质粒细胞需要更多的营养物质，因此磷酸盐和镁离子等营养限制将会使 μ^-/μ^+ 增大，从而导致质粒的不稳定。其中，μ^- 为不含质粒细胞的生长比速率，μ^+ 为含质粒细胞的生长比速率，单位为 s^{-1}。*E. coli* K12 携带 pTP120 质粒（ter^r、Str^r、Ap^r、Sul^r）生长在碳、磷限制的条件下时，ter^r 就会丢失；而 Ap^r 和 Sul^r 则只在磷限制时丢失。碳氮比对工程菌在开放环境中质粒稳定性的影响的研究表明，碳氮比为 0.01 ~10 时，碳氮比越高，细胞增殖越快，表达产物越多，质粒越不稳定。

温度对质粒拷贝数和稳定性也有影响。例如，对于携带质粒 pCK108 的菌株 *Bacillus megaterium*，当培养温度高于最适温度时，质粒稳定性会随温度的升高而降低。当温度高于38℃时，质粒稳定性在细胞的对数生长期的末期就已迅速下降为 55% ~60%。而菌株 *B. stearothermophilus* 携带的质粒 pLP11 在温度低于 50℃是稳定的，当温度高于 50℃时，质粒的稳定性就会降低。

溶氧对微生物的代谢影响很大，对质粒稳定性也有重要影响。充足的溶氧有利于质粒稳定，缺氧则会导致严重的分离不稳定性。研究表明，携带质粒 pLG669 - z 的菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 在无选择压力培养基中进行连续培养时，含质粒细胞的百分数会随溶氧的下降而下降；当溶氧低于 10% 时，质粒的稳定性会非常迅速地下降。

此外，细胞内外源产物的积累也会影响质粒的分离不稳定性。对产聚 3-羟基丁酸酯（PHB）的重组大肠杆菌的质粒稳定性研究表明，细胞内 PHB 的含量越高，质粒的分离不稳定性越显著。

9.2.4 质粒丢失动力学

为了更好地研究质粒稳定性这一复杂过程，实验信息必须和数学工具结合起来。数学模型可以用于机制假设的验证、新实验方案的提出，或者不同水平上的过程设计和优化。对于一个关于重组细胞的具体的生化过程，简单的数学模型一般将生物量分成含质粒细胞和无质粒细胞这两个亚群，它们具有不同的比生长速率并进行生长竞争。与此相反，复杂的数学模型一般都包括蛋白质合成、细胞生长以及质粒复制等各方面的详尽信息。

1. 简单的质粒丢失动力学模型 在实际的工业发酵过程中，大多采用针对含质粒细胞和无质粒细胞进行生长竞争的简单质粒丢失动力学模型。

在重组微生物的发酵过程中，将所有细胞的总浓度用 c_X 表示，含有重组质粒的工程菌的细胞浓度用 c_{X^+} 表示，质粒丢失的宿主菌的细胞浓度用 c_{X^-} 表示，相应的生长比速率分别为 μ^+ 和 μ^-，含质粒细胞占总细胞的比例为 F。则有：

$$c_X = c_{X^+} + c_{X^-} \tag{9-1}$$

$$F = \frac{c_{X^+}}{c_X} = \frac{c_{X^+}}{c_{X^+} + c_{X^-}} \tag{9-2}$$

式中：c_X 为细胞的干重浓度（$g \cdot L^{-1}$）；c_{X^+} 为含质粒细胞的浓度（$g \cdot L^{-1}$）；c_{X^-} 为不含质粒细胞的浓度（$g \cdot L^{-1}$）。

定义 c_{X^-} 和 c_{X^+} 的生长比速率之比为 α，则：$\alpha = \frac{\mu^-}{\mu^+}$。

进一步定义单位时间内含质粒细胞转化为无质粒细胞的概率，也即质粒的相对丢失速率（relative segregation rate）为 p，则在重组菌的分批培养过程中，含质粒细胞和不含质粒细胞的生长速率方程分别为

$$\frac{dc_{X^+}}{dt} = (1-p)\mu^+ c_{X^+} \tag{9-3}$$

$$\frac{dc_{X^-}}{dt} = \mu^- c_{X^-} + p\mu^+ c_{X^+} \tag{9-4}$$

式中：μ^+ 为含质粒细胞的生长比速率（s^{-1}）；μ^- 为不含质粒细胞的生长比速率（s^{-1}）。

假设重组菌和质粒丢失的宿主菌都以恒定的生长比速率进行增殖，则经过 t 时间的培养，重组菌传 n 代后，含质粒细胞在培养液中的比例为

$$F_n = \frac{1-\alpha-p}{1-\alpha-p \cdot 2^{n(\alpha+p-1)}} \tag{9-5}$$

由于丢失质粒的宿主菌往往更具有生长优势，所以 α 值一般为 1 ~ 2。

但在实际发酵过程中，无论是重组菌还是宿主菌，其生长比速率都会随生长周期的改变而变化。设 c_{X^+}、c_{X^-}、c_S、c_P 和 p 分别为含质粒重组菌、不含质粒宿主菌、限制性底物和产物的浓度以及质粒丢失概率，μ_m^+ 和 μ_m^- 分别是重组菌和宿主菌的最大生长比速率，Y^+ 和 Y^- 分别是重组菌和宿主菌的生长得率，K_S 为饱和常数，t 为培养时间，α 和 β 为有关产物合成的参数，β 为新复制的质粒数与初始质粒数的比例系数。则分批发酵过程中重组菌的质粒丢失模型可以描述如下：

$$\frac{dc_{X^+}}{dt} = \frac{\mu_m^+ c_S}{K_S + c_S}(1-p)c_{X^+} \tag{9-6}$$

$$\frac{dc_{X^-}}{dt} = \frac{\mu_m^- c_S c_{X^-}}{K_S + c_S} + \frac{\mu_m^+ c_S p c_{X^+}}{K_S + c_S} \tag{9-7}$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{Y^+}\frac{dc_{X^+}}{dt} - \frac{1}{Y^-}\frac{dc_{X^-}}{dt} \tag{9-8}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = \alpha\frac{dc_{X^+}}{dt} + \beta c_{X^+} \tag{9-9}$$

在上述质粒丢失动力学模型中，都仅仅在细胞表型水平上简单考虑了含质粒重组细胞群和不含质粒宿主细胞群的生长特性和基质消耗特性，而没有考虑细胞内质粒的复制、分布以及染色体 DNA 与质粒 DNA 在前体、能量、营养物质等各方面的竞争等复杂因素的

影响。

2. 单细胞水平质粒分布与产物合成模型 在微生物群体中，二分裂殖体系占据非常重要的地位。*Escherichia coli* 正是其中的典型代表。研究人员以二分裂殖的重组菌株为研究对象，在单细胞水平上建立了质粒分布和产物合成的数学模型。该模型表明，在细胞的生长过程中，单细胞内质粒含量的分布与质粒的复制动力学密切相关。此外，该模型还对含质粒细胞和无质粒细胞的过渡态竞争生长进行了成功的数学模拟。为了更好地说明如何在单细胞水平上采用数学工具描述质粒的复制、分配与生长竞争，参照 Seo 和 Bailey 模型，可以建立如下质粒丢失动力学模型，并进行求解：

1）稳态平衡生长过程中单个细胞内质粒的拷贝数：由于基因重组菌的每一次发酵培养过程都是从抗生素抗性平板上挑取单菌落开始，因此，要建立无选择压力培养过程中含质粒细胞和无质粒细胞状态分布的数学模型，首先必须考察重组菌的种子细胞在抗性平板上进行稳态平衡生长时的质粒分布情况。也就是说，含质粒细胞和无质粒细胞进行混合培养的初始条件是含质粒细胞的稳态平衡生长。

（1）稳态条件下含质粒细胞的菌龄分布函数：含质粒细胞从上一次分裂开始，到下一次分裂结束，经历了一个细胞周期（世代时间）的变化。在这个细胞周期中，菌龄是影响含质粒细胞中质粒分布的参数之一。为此，本模型以菌龄为自变量，建立稳态条件下含质粒细胞的菌龄分布函数，并在质粒复制与分离的基础上进一步建立含质粒细胞的质粒分布模型。

以 a 代表菌龄（设：新生菌的菌龄为零，正在分裂的细菌的菌龄为 T，即一个世代的时间为 T），v 为含质粒细胞的总生长比速率。则含质粒细胞在整个细胞群中的比例 $W(a)$ 即为含质粒菌的分布函数。在稳态的指数生长期，含质粒菌分布函数随菌龄的变化有如下的关系式：

$$\frac{dW(a)}{da} = -vW(a) \tag{9-10}$$

设 θ 为有质粒的细胞在分裂时产生出无质粒细胞的概率，则正在分裂的细胞与新生细胞间还应存在如下平衡关系：

$$W(0) = (2-\theta)W(T) \tag{9-11}$$

在存在选择压力的稳态平衡生长条件下，公式（9-10）的解应满足下面的归一化条件：

$$\int_0^T W(a)da = 1 \tag{9-12}$$

以式（9-11）、式（9-12）为边界条件，即可得到式（9-10）的解为：

$$W(a) = \left(\frac{2-\theta}{1-\theta}\right)\nu e^{-\nu a} \tag{9-13}$$

将式（9-13）代入式（9-12）中，即可得到含质粒细胞的比生长速率 v、细胞生长的世代时间 T 和表征质粒不稳定性的参数 θ 之间有如下关系式：

$$\nu = \frac{\ln(2-\theta)}{T} \tag{9-14}$$

其中，世代时间（T）代表的是单个细胞的一个生长周期，它与细胞群的生长比速率是不同的概念，二者不能混为一谈。在模型计算时，质粒的分离不稳定因子通常取单一值，但实际上，不稳定因子也应随着细胞世代数的变化而变化，这会对 T 的计算产生一定的影响，而这种影响的程度我们并不知道有多大，只能假设可以忽略。

（2）新生细胞中的质粒数分布：在稳态条件下含质粒细胞菌龄分布的基础上，可以根据质粒的复制机制导出单个新生细胞中的质粒数分布模型。

首先，根据出生时细胞内所含质粒数的不同，可以将整个细胞群划分为不同的细胞亚群。其中，出生时含有 x 个质粒的细胞群的年龄分布为：

$$W_x(a) = c_x e^{-\nu a} \tag{9-15}$$

其中，c_x 为出生时含有 x 个质粒的细胞群的年龄分布系数。设细胞中所含质粒的拷贝数为 N，则在质粒分布的所有范围内，有：

$$\sum_{x=1}^{N} c_x e^{-\nu a} = W(a) = \left(\frac{2-\theta}{1-\theta}\right)\nu e^{-\nu a} \tag{9-16}$$

对质粒的复制和分配机制进行不同的假设，求解式（9-16），就可得到不同的 c_x，继而得到含不同质粒数的细胞的菌龄分布函数 $W_x(a)$ 。

① c_x 初始迭代值的确定：首先在最简化的模型假设基础上，计算出一个合适的 c_x，作为更复杂模型的初始迭代值。

依照 Seo 和 Bailey 的模型中的 Model Ⅰ，假设所有处在分裂阶段的细胞中都含有 N 个质粒，且所有质粒都按照随机分配的规律分配到子代细胞中去。此外，在质粒的复制过程中，还假设存在着这样的控制机制，即无论出生时分配得到的初始质粒数为多少，在一个细胞周期中，质粒数均在达到一定数目（N）时就停止复制。

设 γ 为母代细胞中某一质粒分配到某一特定子代细胞中去的概率，则从含有 N 个质粒的母代细胞中分裂出含有 x 个质粒的子代细胞的概率，可用二项式分布函数 $f(x;N)$ 表示，即：

$$f(x;N) = \frac{N!}{x!(N-x)!}\gamma^x(1-\gamma)^{N-x} \tag{9-17}$$

将式（9-17）与式（9-14）、式（9-16）一起推导并简化后，即有：

$$c_x = \frac{\nu}{1-\theta}\left[f(x;N) + f(N-x;N)\right] \tag{9-18}$$

其中，θ 还可以表示为：

$$\theta = f(0;N) + f(N;N) \tag{9-19}$$

式中：θ 为有质粒细胞在分裂时产生出无质粒细胞的概率。

对于二分裂殖细胞的均衡随机分配过程，某一质粒分配到两个子代细胞中去的概率是完全相同的，因此 γ 的值就可被定为 0.5。而对于那些不均衡分裂的细胞，γ 则为一个经验值。

由式（9-19）可见，在本模型假设的条件下，从母代细胞中分离出不含质粒的细胞概率 θ 为常数，它与细胞分裂世代数的变化无关。在一定的 N 和 γ 值的条件下，求出 θ，并代入实际培养过程的总生长比速率 v，由式（9-18）即可求出作为更复杂模型的初始迭代值的 c_x。

② 模型的建立和求解：对 *E. coli* R1 质粒复制过程的研究表明，受到调控的是每个细胞周期中新合成的质粒数，而不是正在分裂的细胞中的质粒数。因此，假设含质粒细胞每个细胞周期可以合成一定数目的质粒，要比假设正在分裂的细胞中的质粒数是常数更精确地近似质粒的实际复制控制体系。

依照 Seo 和 Bailey 模型中的 Model Ⅱ，假设每个细胞在每一世代都复制出 K 个新质粒，除非细胞中的质粒数达到某一最大值 N_m。此外，当母代细胞分裂时，其中的所有质粒也都

均衡随机分配到子代细胞中去。

在上述假设的基础上，对于出生时含不同质粒数的细胞，分别有：

$$c_X = \frac{1}{2-\theta}\left\{\left[f(x;N_m) + f(N_m - x;N_m)\right]\sum_{i=N_m-k}^{N_m} c_i + \sum_{i=k+1}^{N_m-1}\left[f(x;i) + f(i-x;i)\right]c_{i-k}\right\}$$

$$(1 \leqslant x \leqslant k+1) \tag{9-20}$$

$$c_X = \frac{1}{2-\theta}\left\{\left[f(x;N_m) + f(N_m - x;N_m)\right]\sum_{i=N_m-k}^{N_m} c_i + \sum_{i=x}^{N_m-1}\left[f(x;i) + f(i-x;i)\right]c_{i-k}\right\}$$

$$(k+2 \leqslant x \leqslant N_m) \tag{9-21}$$

$$\theta = \frac{1}{\sum_{i=1}^{N_m} c_i}\left\{\left[f(N_m;N_m) + f(0;N_m)\right]\sum_{i=N_m-k}^{N_m} c_i + \sum_{i=k+1}^{N_m-1}\left[f(i;i) + f(0;i)\right]c_{i-k}\right\} \tag{9-22}$$

式中：N_m 为细胞中质粒的最大拷贝数。

这一模型中的最大质粒拷贝数 N_m 没有具体的物理意义，仅仅是为了给数学方程组设定截止计算的边界的变量。当 $N_m \gg K$ 时，计算所得的细胞中的质粒分布就与 N_m 无关。

此外，在本模型中，由于某一特定细胞周期中的质粒分布会影响到下一个细胞周期中的质粒分布，因此也就体现了由于细胞分裂时质粒的随机分配所导致的拷贝数差度对后代细胞的质粒分离不稳定性的影响。

代入 c_x 的初始迭代值，对式（9-20）～式（9-22）进行求解，即可得到 c_x 的数值解。

③ 对 Seo-Bailey 模型的修正：根据对质粒复制过程的越来越深入的研究，可以合理地假设，在一个细胞周期内新复制的质粒数 K 与细胞诞生时所包含的初始质粒拷贝数（X_C）成正比例关系：

$$K = \beta \cdot X_C \tag{9-23}$$

其中，β 为新复制质粒数与初始质粒数的比例系数。β 的大小应该在测定细胞内 RNA 聚合酶水平的基础上，采用更为复杂的质粒复制模型来确定。但由于实验条件的限制，目前实验室仍无法具体测定这些数值。因此，可以依据前人的经验将 β 假设为 1。

此外，还同时设定质粒的最大复制拷贝数为 K_m。当由式（9-23）计算所得的 K 超过 K_m 时，则一律按 K_m 计算。即：

$$\begin{aligned} K \geqslant K_m,\quad K = K_m \\ K < K_m,\quad K = X_C \end{aligned} \tag{9-24}$$

式中：K 为细胞在一个世代中复制的新质粒数；K_m 为质粒最大复制拷贝数。

这里 K_m 可视为表征重组细胞中质粒复制能力的一个参数。一般来讲，当重组细胞在完全理想的条件下培养时，K_m 应是一个定值，它由质粒或宿主的基因特性所决定。但在实际的培养过程中，由于实验条件的限制，宿主和质粒之间的相互作用将影响 K_m 的大小。

由实验测定可知，一个生长在 LB^+ 平板上的中等大小的大肠杆菌单菌落，一般含有 $10^5 \sim 10^8$ 个细胞；要形成这样的一个单菌落，细胞一般要经过 15～25 次分裂。由于单菌落中各个细胞所处的环境条件不同，因此，各个细胞的生理特性也不同，从而使不同细胞内质粒的复制和分布情况也不同。

考虑到随着细胞的世代数的增加，细胞逐渐老化对质粒复制能力的影响，不妨假设K_m将随细胞世代数 n 的增大而线性减小。即：

$$K_m^n = K_m^{n-1} - l \tag{9-25}$$

其中，当 $n-1=0$ 时，K_m^0 体现了重组细胞中质粒复制能力的上限，l 则表征细胞中质粒拷贝数的下降幅度。

2）细胞群中有质粒细胞和无质粒细胞混合培养的过渡生长模型：就整个细胞群而言，由于质粒在子代细胞中的分配过程为随机分配，因此，在 LB^+ 平板上稳态生长的种子一旦接入无抗生素选择压力的培养基中，即可能开始了有质粒细胞和无质粒细胞同时生长的混合生长过程。以稳态条件下含质粒细胞的菌龄分布函数为初始条件，v 仍为含质粒细胞的总体生长比速率，T^- 和 T^+ 分别为无质粒和有质粒细胞的世代周期。这样细胞群中的状态分布就依赖于两个参数：细胞的菌龄 a 和转入两种细胞都可以生长的培养基中的时间 t。

分别对有质粒和无质粒细胞的细胞群建立过渡态细胞增殖平衡方程。设 U^- 和 U^+ 分别为无质粒细胞和有质粒细胞的增殖函数。

（1）有质粒细胞

$$\frac{\partial U^+}{\partial a} + \frac{\partial U^+}{\partial t} = 0 \tag{9-26}$$

初始条件和边界条件分别为

$$U^+(a,0) = \frac{2-\theta(m)}{1-\theta(m)} v e^{-va} = p^+(a) \tag{9-27}$$

$$U^+(0,t) = \big(2-\theta(m)\big) U^+(T^+,t) = q^+(t) \tag{9-28}$$

式（9-26）的特征线方程为 $a-t=$常数$=c$，因此式（9-26）的解的形式为：

$$U^+ = U^+(a-t) \tag{9-29}$$

如图 9-3 所示，在每一条特征线上的 c 值都是相等的，其上的 U_c^+ 值也都相同。

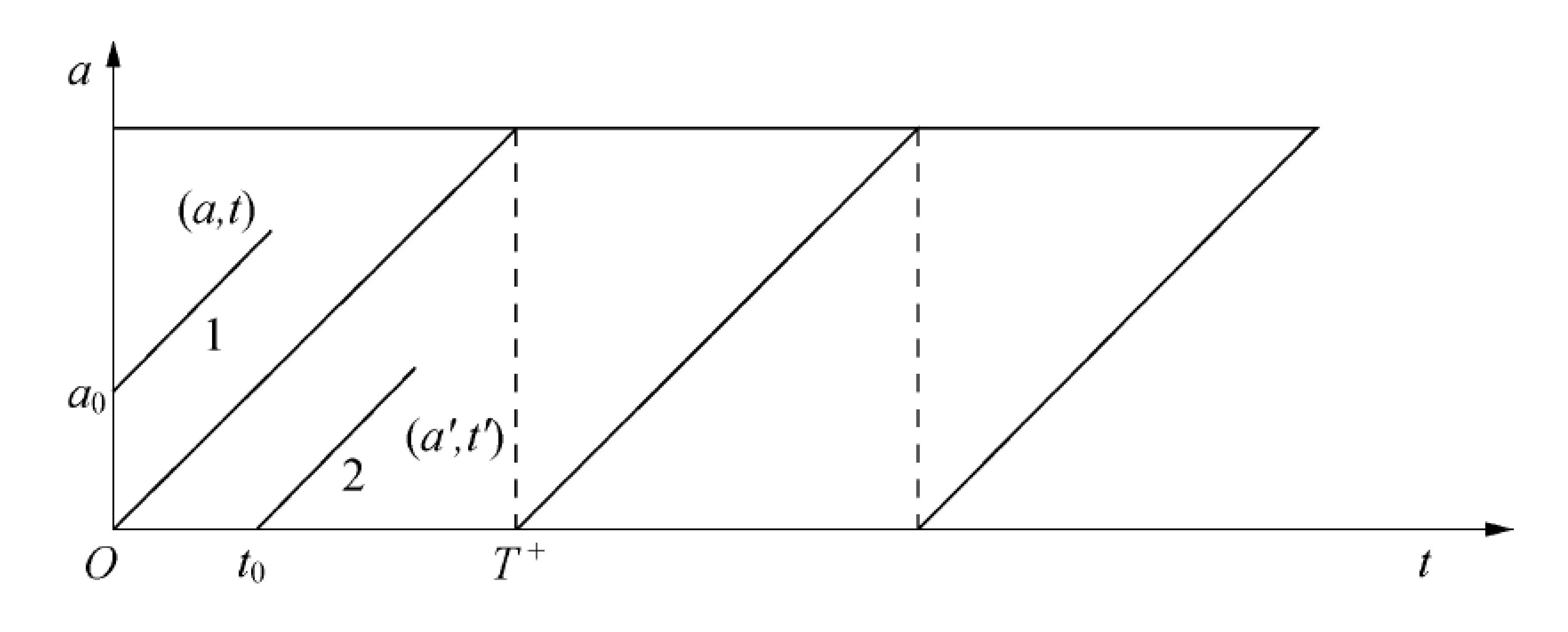


图 9-3　有质粒细胞的过渡态细胞增殖平衡方程的特征线

1：特征线 1；2：特征线 2

由坐标之间的关系可知：

$$a_0 = a - t \tag{9-30}$$

$$t_0 = t - a \tag{9-31}$$

当 $a>t$ 时，在特征线 1 上 U^+值相等，推出：

$$\begin{aligned} U^+(a,t) &= U^+(a_0,0) = p^+(a_0) \\ &= \frac{2-\theta(m)}{1-\theta(m)} v e^{-va_0} = \frac{2-\theta(m)}{1-\theta(m)} v e^{-v(a-t)} \end{aligned} \tag{9-32}$$

当 $a<t$ 时，在特征线 2 上 U^+ 值相等，推出：

$$U^+(a,t)=U^+(0,t_0)=q^+(t_0)=(2-\theta(m))U^+(T^+,t_0)$$
$$=\frac{(2-\theta(m))^2}{1-\theta(m)}\nu e^{-\nu(T^+-t_0)}=\frac{(2-\theta(m))^2}{1-\theta(m)}\nu e^{-\nu[T^+-(t-a)]} \tag{9-33}$$

当 $m=1$ 时，推导公式如前；

若 $m>1$，设 tt 为第 m 个周期内的时间，则：

当 $a>tt$ 时，

$$U^+(a,t)=U^+(a_0,(m-1)\times T^+) \tag{9-34}$$

其中 $a_0=a-tt$；

当 $a<tt$ 时，

$$U^+(a,t)=(2-\theta(m))U^+(T^+,t_0)=(2-\theta(m))U^+(T^+,tt-a) \tag{9-35}$$

（2）无质粒细胞

$$\frac{\partial U^-}{\partial t}+\frac{\partial U^-}{\partial a}=0 \tag{9-36}$$

初始条件和边界条件分别为

$$U^-(a,0)=0=p^-(a) \tag{9-37}$$
$$U^-(0,t)=\theta(m)U^+(T^+,t)+2U^-(T^-,t)=q^-(t) \tag{9-38}$$

同有质粒细胞类似，式（9-36）的特征线方程为 $a-t=$常数$=c$，因此式（9-36）的解的形式为

$$U^-=U^-(a-t) \tag{9-39}$$

如图 9-4 所示，在每一条特征线上的 c 值都是相等的，其上的 U_c^- 值也都相同。

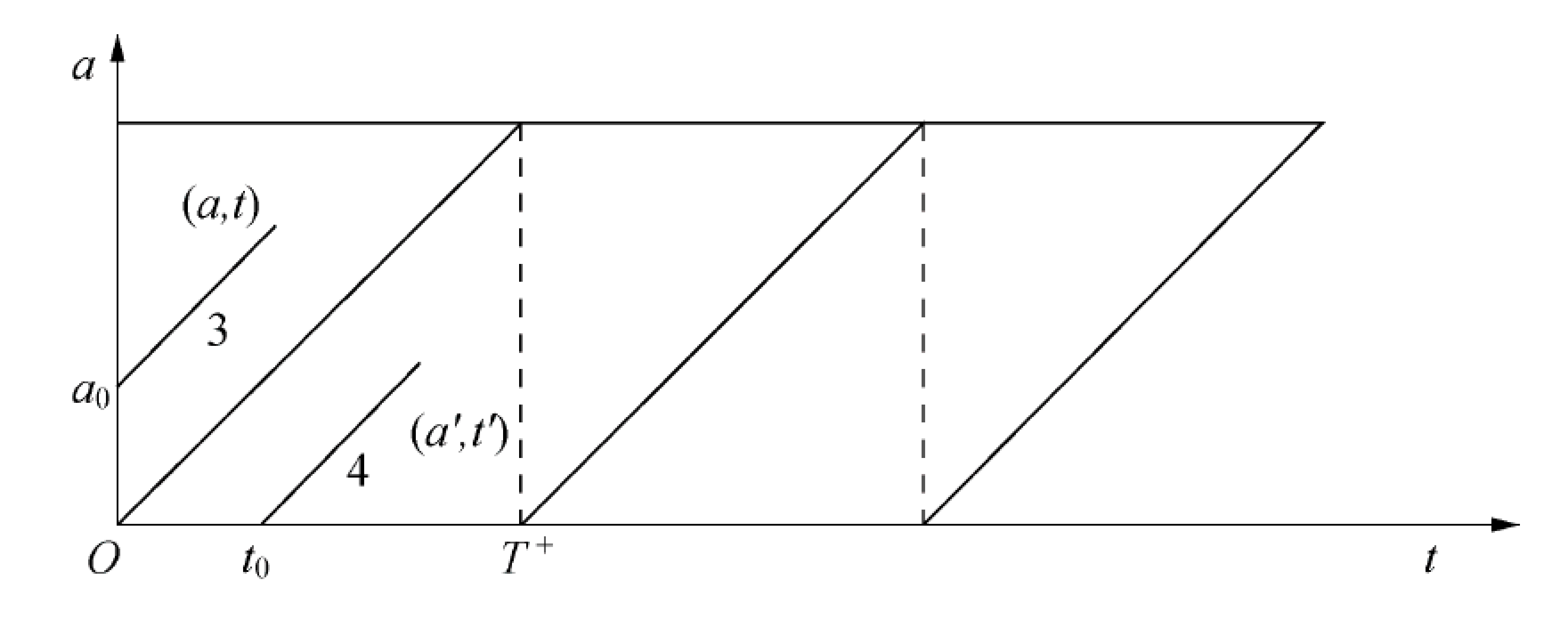


图 9-4　无质粒细胞的过渡态细胞增殖平衡方程的特征线

3：特征线 3；4：特征线 4

当 $a>t$ 时，在特征线 3 上 U^- 值相等，推出：

$$U^-(a,t)=p^-(a_0)=0 \tag{9-40}$$

当 $a<t$ 时，在特征线 4 上 U^- 值相等，推出：

$$U^-(a,t)=q^-(t_0)=\theta(m)U^+(T^+,t_0)+2U^-(T^-,t_0)$$
$$=\theta(m)\frac{2-\theta(m)}{1-\theta(m)}\nu e^{-\nu[T^+-(t-a)]}+0 \tag{9-41}$$

类似有质粒细胞，当 $m=1$ 时，推导公式如前；

若 $m>1$，设 tt 为第 m 个周期内的时间，则：

当 $a>tt$ 时，

$$U^-(a,t)=U^-(a-tt,(m-1)T^-) \tag{9-42}$$

当 $a < tt$ 时,

$$U^{-}(a,t) = \theta(m)U^{+}(T^{+},t_0) + 2U^{-}(T^{-},t_0) \tag{9-43}$$

其中 $t_0 = tt - a + (m-1)T^{-}$。

每一种细胞的总个数可通过对所有菌龄的细胞数进行加和而得到。以 $N^{+}(t)$ 和 $N^{-}(t)$ 表示时刻 t 时含质粒和不含质粒的细胞数，含质粒数细胞的比例即由下式给出：

$$\Phi_P(t) = \frac{N^{+}(t)}{N^{+}(t) + N^{-}(t)} \tag{9-44}$$

式中：$\Phi_P(t)$ 为 T 时刻含质粒的细胞的比例。

对于以上数学模型，如果想维持含质粒细胞的稳定性，应满足以下条件：

$$\lim_{m\to\infty} \Phi_P(m) \neq 0 \tag{9-45}$$

式（9-34）、式（9-35）、式（9-42）、式（9-43）、式（9-44）将质粒的不稳定性与相应的所需要的培养基质的调整关联起来，使得含质粒的细胞可以和不含质粒的细胞进行足够的竞争。对其进行关联求解，即可得到含质粒细胞的百分数随细胞世代数的变化关系。

通过这种平衡增殖逼近的方法，质粒的复制调控（以复制模型表示）、质粒的拷贝数特征和总的系统操作参数（这具有很重要的实际意义）明确地关联了起来。

（3）模型的实际应用：国内学者在研究重组大肠杆菌 VG1（pTU14）的质粒稳定性时，在无产物积累条件下，对 VG1（pTU14）在 LB 培养基中进行连续传代培养，考察含质粒细胞的百分数随世代数的变化关系，并将所得实验结果与 Seo – Bailey 的模型结果相比较，结果发现，模型结果与实验结果相去甚远（如图 9-5 所示）。

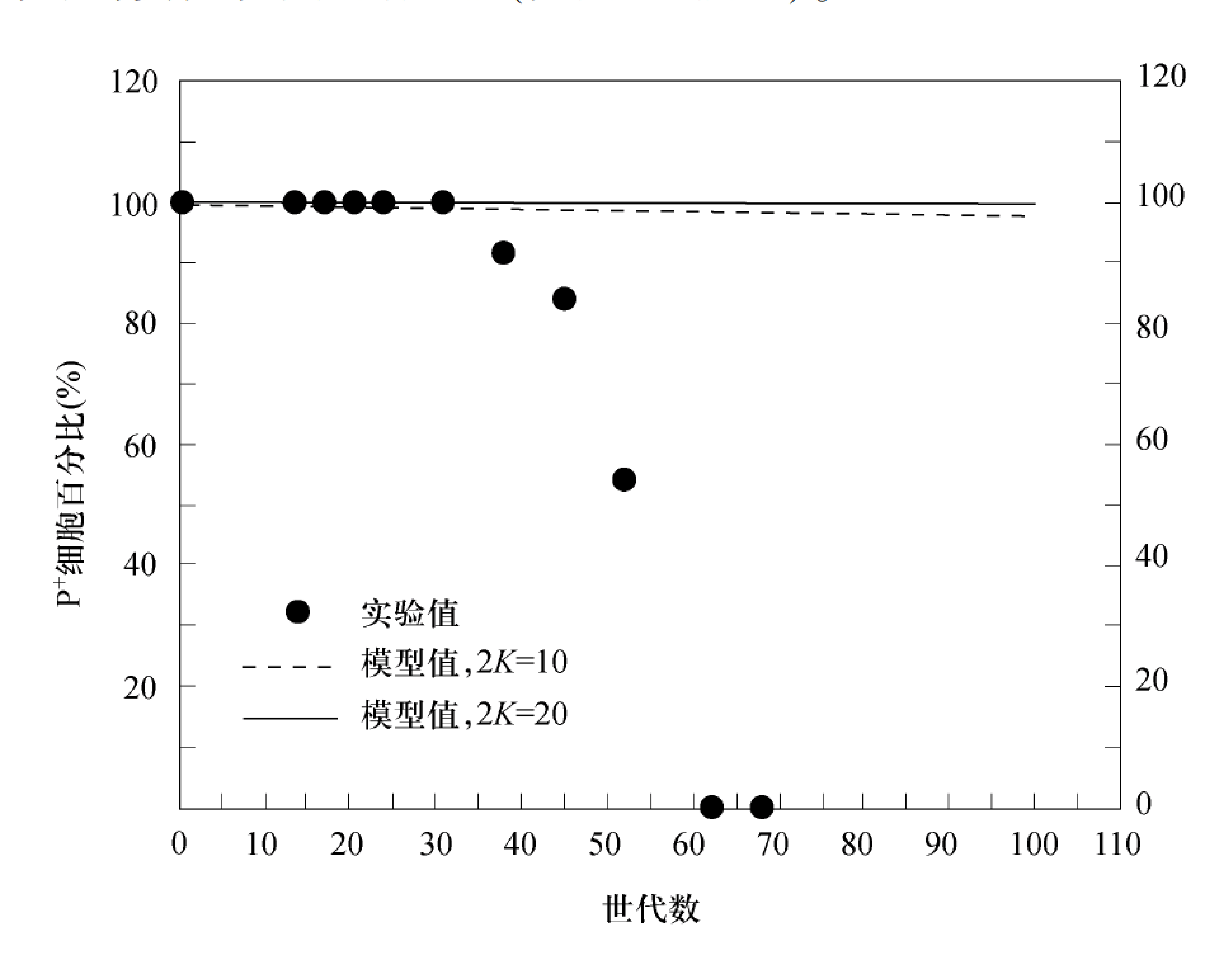


图 9-5　实验结果与 Seo – Bailey 模型结果的比较

采用修正的 Seo – Bailey 模型，且 K_m^0 和 l，以及 N 和 N_m 的具体数值均根据如下实验结果计算（表 9-2）。

表 9-2 无聚 3－羟基丁酸酯（PHB）积累条件下 VG1（pTU14）中质粒的平均拷贝数随世代数的变化

细胞世代数	质粒拷贝数	N_m	N	l	K_m^0
10	70				
30	56	110	80	2/3	20
60	40				

由表 9-2 可见，当在不同世代下测定 VG1（pTU14）中质粒 pTU14 的拷贝数时，发现其平均拷贝数的大小随细胞世代数的增加而迅速下降。平均而言，细胞每经历 3 次分裂，细胞中质粒的平均拷贝数就下降 2 个单位，即 l 值为 2/3。考虑到质粒 pTU14 在重组细胞内主要以二聚体形态存在，这就意味着细胞每经过 3 次分裂，就平均丢失一个二聚体质粒。

以前 20 世代质粒拷贝数平均下降 14 个单位的规律进行逆推，同时注意到质粒复制的下降速率随细胞世代数的增加而变缓，即可得到初始条件下，即 0 世代时重组细胞中的平均质粒拷贝 N 为 80。由于细胞中的质粒数分布为正态分布，因此 N_m 按照统计学取 4σ 处的单细胞中的质粒数，即为 110；K_m^0 则按照经验取值为 N 的 1/4，即为 20。

将本模型假设和各参数值代入式（9-20）~式(9-22)，即可得到修正条件下 VG1（pTU14）的 c_X 和质粒分离不稳定因子 θ 值；其中，由于细胞内没有 PHB 产物的积累，因此 γ 设定为 0.5。进一步代入有质粒细胞和无质粒细胞混合生长的过渡态方程，可得到含质粒细胞的百分含量随细胞世代数的变化关系曲线。将该模型理论值与实验值进行对比，结果见图 9-6。

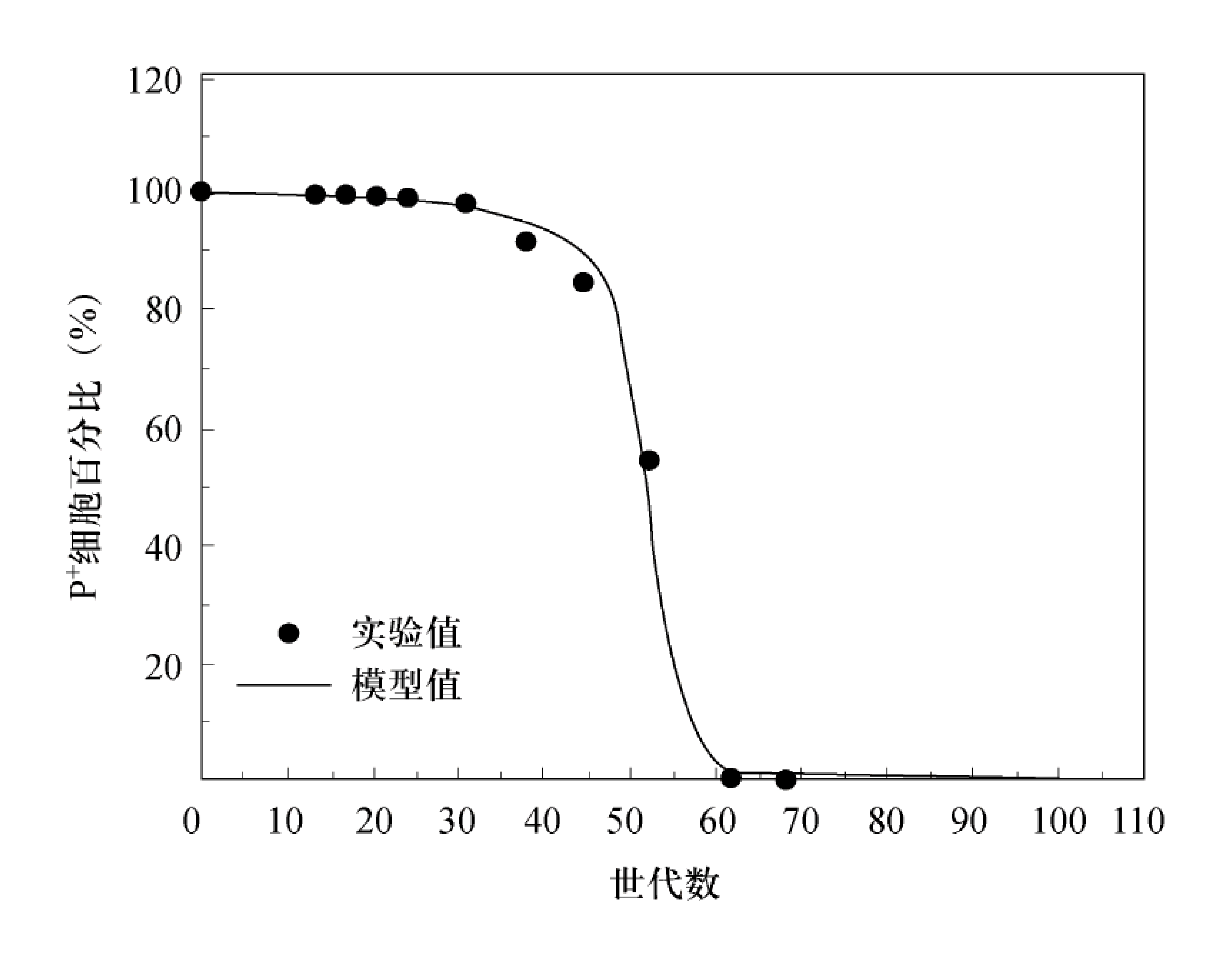


图 9-6 无 PHB 积累条件下理论值与实验值的拟合情况

由图 9-6 可见，由修正后的数学模型拟合得到的含质粒细胞百分数随世代数的变化曲线与实验结果具有完全相同的变化趋势，说明该模型可以从单细胞水平上良好反映宏观的实验过程。

9.2.5 解决质粒不稳定性问题的策略

含质粒重组微生物的质粒不稳定性使得它难以进行连续发酵，所以，工程菌的培养通常采用分批或补料分批方式。但是，最根本的解决办法仍应从基因水平的设计与调控入手。

解决质粒不稳定性问题的基本策略可以划分为细胞/分子策略及生物过程策略两大类。其中，细胞/分子策略是最根本的解决策略，它可以分别从不使用质粒载体、不产生无质粒细胞、质粒丢失细胞的致死效应以及控制外源基因的过度表达等几个方面入手。

1. 细胞/分子策略

（1）不使用质粒载体的策略：将外源基因直接整合到宿主的染色体上进行表达，这是从根本上消除质粒不稳定性的分子策略之一。这种方法受到对宿主菌基因背景的了解程度以及外源基因表达拷贝数的限制。

（2）不产生无质粒细胞的策略：在质粒载体中引入可以实现质粒在子代细胞中的主动分配或配对位点分配的基因（如 *parA* 和 *cer*），就可以保证每个子代细胞中至少含有一个质粒，从而从根本上消除空载细胞的出现。

（3）质粒丢失细胞致死策略：在质粒载体中引入质粒丢失细胞的条件致死基因，可以有效杀死质粒丢失的空载细胞，从而保证质粒的稳定遗传。例如，研究人员对质粒 R1 中的稳定性位点 *parB* 的组成进行研究，发现 *parB*（*hok-sok*）基因产物的共同作用可以杀死 *parB* 基因缺失的细胞，从而长时间地保证质粒的稳定遗传；将 *parB* 基因引入其他质粒载体，可以实现同样的目的。将细胞生长和 DNA 复制所必需的大肠杆菌 DNA 单链结合蛋白 *ssb* 基因克隆到表达型质粒上，构成对无重组分子受体细胞的致死效应，也是一种较为理想的策略。

根据载体所携带的遗传标记，在培养基中添加抗生素、利用宿主菌产生的菌素、利用单营养缺陷或双营养缺陷菌株以及噬菌体的溶源菌株等都是该方法的范畴。其中，在重组细胞培养基中添加氨基酸、核苷酸和抗生素等选择压力，能有效抑制丢失重组分子的受体细胞生长。但用于大规模生产时成本较高，而且抗生素在重组蛋白药物生产中也有禁止使用的趋势。

（4）控制外源基因的过度表达：在外源基因表达系统构建过程中引入温度敏感型或其他可控复制子和启动子，可以大幅度减少由于重组分子大量扩增及目的产物过量表达对受体细胞正常生理代谢造成的干扰作用，从而增加质粒遗传的稳定性。其中，使用可控型复制子可以控制质粒的定时增殖或降低质粒的拷贝数；而使用可控型启动子则可以控制目的基因的定时表达及表达程度，使得细胞的快速生长和目的基因的高表达解除耦联，最终强化质粒载体的遗传稳定性。

2. 生物过程策略

（1）优化培养条件：许多培养参数对重组细胞的稳定性具有直接或间接的影响，其中以细胞比生长速率最为显著。从理论上来讲，任何能降低 μ^-/μ^+ 比值的培养条件均有利于重组分子的稳定遗传。培养条件一般包括培养基组分、培养温度、pH 和溶氧浓度等几个方面。通常情况下，营养限制、pH 、温度和溶氧等参数对质粒稳定性都有比较大的影响；其中，较低的培养温度更有利于重组质粒的稳定。还可以采用两步发酵或不同稀释率、不同基质浓度之间的循环来抑制 P^- 细胞的生长优势。

（2）优化培养方式：微生物的培养方式包括分批培养、补料分批培养（半连续培养）、连续培养、固定化培养以及透析培养或其他分离耦合培养等。通过间歇改变培养方式，可以改变培养条件和细胞的比生长速率。由于含质粒基因工程菌的质粒不稳定性，连续培养比较困难。为了解决这一问题，人们将工程菌的生长阶段和基因表达阶段分开，进行两阶段连续培养。在这样的系统中关键的控制参数是诱导水平、稀释率和细胞比生长速率。透析培养技术是利用膜的半透性原理使培养物和培养基分离，其主要目的是通过去除培养液中的代谢产

物来解除其对生产菌的不利影响。利用选择性絮凝或双液相系统分离 P^- 细胞，也可以增强工程菌的稳定性。研究表明，重组细胞的固定化培养技术也可以大大提高质粒的稳定性和克隆基因产物的表达水平。

9.3 重组蛋白的高表达

9.3.1 异源蛋白在重组微生物中高表达的基本策略

外源基因在重组微生物中表达时，其表达水平受到基因序列特征（密码子和 GC 含量等）、基因剂量、基因复制、转录和翻译效率及其调控因子、mRNA 的稳定性以及宿主细胞和载体的特性等多种因素的影响。同时，外源基因的表达水平也和重组微生物培养的外部环境条件密切相关。因此，优选的基因表达策略和优化的外部培养条件是决定异源蛋白在重组微生物中高表达的两个重要方面。这里的重组微生物包括细菌、放线菌、酵母菌、霉菌等各种重要的工业微生物。

异源蛋白在重组微生物中表达时，优选的基因表达策略通常要考虑如下基本要素。

1. 确定理想的受体细胞 它应具备如下基本特征：具有比较清晰的基因遗传背景，具有基因工程安全性，生长较为迅速，培养成本较为低廉等。表 9-3 总结了大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母这 3 种典型的革兰阴性、革兰阳性细菌和酵母菌模式受体细胞的优、缺点。

表 9-3 3 种典型基因工程受体细胞的优缺点

典型受体细胞	优点	缺点
革兰阴性菌：大肠杆菌	（1）安全的基因工程受体细胞； （2）分子遗传学背景清楚； （3）基因克隆表达系统成熟完善； （4）繁殖迅速、培养工艺简单、成熟； （5）异源蛋白表达效率高。	（1）缺乏对真核生物蛋白质的糖基化修饰及翻译后加工系统，真核异源蛋白不能有效折叠； （2）内源性蛋白酶对异源蛋白的降解效应； （3）细胞周质内含有种类繁多的内毒素。
革兰阳性菌：枯草芽孢杆菌	（1）安全的基因工程受体细胞； （2）分子遗传学背景清楚； （3）基因克隆表达系统成熟完善； （4）异源蛋白易于实现分泌表达； （5）大规模培养工艺成熟。	（1）缺乏对真核生物蛋白质的糖基化修饰及翻译后加工系统，真核异源蛋白不能有效折叠； （2）大量的胞内胞外蛋白酶； （3）异源蛋白的表达效率较低。
酵母菌：酿酒酵母	（1）安全的基因工程受体细胞； （2）分子遗传学背景清楚； （3）具有较完善的糖基化系统和蛋白质翻译后加工能力； （4）表达蛋白容易分泌； （5）大规模发酵成本低廉。	（1）异源蛋白表达效率一般较低； （2）培养周期较长。

如表 9-3 所述，在选择受体细胞时，要根据目的外源蛋白的来源和特征，综合考虑受体

细胞的优、缺点，确定受体细胞的选择方案。来自真核生物的异源蛋白，通常选择酵母菌表达体系，或者采用大肠杆菌表达包涵体再复性的策略。来自微生物的工业酶的表达，通常选择大肠杆菌或枯草芽孢杆菌等典型的革兰阴性或阳性重组表达受体。

宿主细胞的选择还应该根据具体的表达目的进行具体分析。有些情况下，基因遗传信息尚不完全清楚的野生宿主具有良好的生产特性，也往往成为基因工程操作的优选对象。

另外，为了解决受体细胞内的蛋白酶对外源蛋白的降解问题，可以选用专门构建的蛋白酶缺陷型受体细胞（如 lon^{-}），以高效表达各种不稳定的重组异源蛋白。另外，乙酸的大量积累会严重抑制菌体生长和目的基因的表达，因此，有研究人员专门构建了乙酸合成阻断型菌株，以减少或消除乙酸的产生。再有，为了促进宿主细胞在贫氧条件下的生长特性以及目的产物的生产，还可以将透明颤菌血红蛋白（VHb）基因等插入到宿主菌的染色体，构建具有良好生长特性的受体细胞。

2. 确定理想的基因　一个优选的异源蛋白表达策略，针对不同的受体细胞，还必须考虑基因本身的来源特征。首先，编码合成的蛋白酶具有高活性的外源基因，是克隆表达的首选。其次，针对不同的受体细胞，外源基因在该宿主中表达时的稀有密码子数量不能太多。另外，基因的 GC 含量过高，也经常会影响最终的表达效果。随着分子生物学技术的发展，根据外源蛋白的氨基酸序列和不同宿主的密码子偏爱性，对外源基因进行从头设计与基因合成，消除或减少基因中的稀有密码子、降低 GC 含量等基因工程手段已经日益成熟。

3. 确定理想的表达载体　外源基因的表达主要依赖于基因的复制、转录和翻译过程。在确定理想的受体细胞和外源基因之后，表达载体的选择、设计与重组构建是外源基因高效表达的关键。理想的表达载体，应考虑如下几个方面的要素。

1）异源蛋白的表达方式：表达载体的设计首先要确定异源蛋白的表达方式，是细胞内表达，还是分泌到细胞外表达；是可溶的活性表达，还是包涵体型失活表达等。不同的表达方式，对应于不同的宿主体系、不同特征的质粒载体和基因重组方案，以及不同的分析鉴定方法。比如，分泌型表达通常选用革兰阳性宿主或酵母菌宿主，并需额外重点考虑信号肽问题和异源蛋白的稳定性等问题；包涵体型表达则一般用于某些高附加值药用高等动物蛋白在微生物中的重组表达，着重考虑表达量，而不需要考虑蛋白质表达时的可溶性和活性等。一般而言，异源蛋白在原核细胞中的胞内可溶型活性表达是蛋白酶等工业生物催化剂的主要表达方式，也是本章介绍的重点内容。

2）外源基因的复制调控——提高外源基因的剂量：从基因复制的角度考虑，外源基因的高表达策略首先应该确定基因的表达剂量。对于质粒上的外源基因，基因剂量主要决定于质粒的拷贝数以及质粒的结构和分离稳定性。质粒拷贝数是质粒载体的一个基本特征，通常具有高（数百个拷贝）、中（数十个拷贝）、低（数个拷贝）3 种类型。也有将具有高、中拷贝数的质粒称为松弛型质粒，而低拷贝质粒则称为严谨型质粒。

生长旺盛的大肠杆菌细胞的核糖体单位的数量（约 2 万个）远远大于 mRNA 分子的数量（约 1500 个）。因此，外源基因的剂量越高，转录效率越高，越可能实现外源基因的高效表达。然而，由于质粒拷贝数的扩增通常发生在细胞的对数生长期，因此，质粒分子的过度扩增和外源基因的过度表达必将影响受体细胞的正常生长与代谢，反过来导致外源基因表达水平的下降。综合考虑这两方面的影响因素，外源基因的高表达需要选择具有合适拷贝数的载体。在某些情况下，将外源基因插入受体细胞的染色体，也是很好的基因重组策略。

3）外源基因的转录调控——优化基因的转录过程：从基因转录的角度考虑，外源基因

的高表达应重点考虑基因的启动子和终止子。

（1）启动子的选择：对于异源蛋白的胞内可溶、活性表达，启动子的种类和强度是最重要的影响因素之一。启动子是位于基因 5′末端上游，并能与 RNA 聚合酶（RNAP）结合形成转录起始复合物的 DNA 区域，长度从 20 到 200bp 不等，甚至更长。通常与调节蛋白结合的位点也包括在启动子中。在描述碱基的位置时，一般将开始合成 mRNA 的第一个核苷酸定为转录起点，用数字表示为 +1，启动子区域的上游方向依次为 -1、-2、-3……启动子的强度受其 -10 区和 -35 区的特征序列及其间隔序列的影响。近年来，专门针对启动子的上述区域进行大规模突变研究的“启动子工程”（promoter engineering）受到很多研究学者的重视。

启动子按种类划分，通常分为组成型（constitutive）和诱导型（inducible）这两种基本形式（也有学者划分为组成型和调节型，其中调节型包括诱导型和抑制型）。组成型指细胞在生长过程中不断合成 mRNA，外源基因的表达与细胞生长同步。组成型表达通常选用相对较弱的启动子，一般用于表达产物对细胞生长影响不大的情况。诱导型指基因的操纵子通常与某种抑制物结合，只有当某种外部因素加入解除抑制后，基因的转录过程才能正常开始，即基因的表达受到某种外部因素的诱导调控。由于诱导型启动子可以避免外源蛋白的快速高效表达对细胞生长造成的影响，因此启动子的强度通常较强，在外源基因的重组表达过程中具有广泛的应用。

常用的大肠杆菌诱导型启动子如表 9-4 所示。

表 9-4　几种典型大肠杆菌诱导型启动子

启动子名称	来源	-35 序列	-10 序列	转录相对活性	诱导方式
lac/lacUV5	大肠杆菌乳糖操纵子	TTTACA	TATAAT	1	添加 IPTG* 或乳糖，热诱导
trp	大肠杆菌色氨酸操纵子	TTGACA	TTAACT	3	除去色氨酸或添加 3-吲哚丙烯酸（IAA）
tac	trp-lac 杂合启动子	TTGACA	TATAAT	7 ~ 11	添加 IPTG 或乳糖，热诱导
P_L	λ 噬菌体	TGACTA	GATAAT	8 ~ 10	热诱导
T7	T7 噬菌体	TAATACGACTCACTATA		T7 RNAP 比 *E. coli* RNAP 快 5 倍	添加 IPTG 或乳糖

* IPTG：异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷

（2）终止子的选择：外源基因在强启动子的控制下容易产生转录过度现象，从而降低转录速度，影响 mRNA 的翻译。因此，在将外源基因插入表达载体时，需要在基因下游安装较强的转录终止子。该终止子可以是外源基因的天然转录终止子，也可以是载体上携带的强终止子，如来自大肠杆菌 rRNA 操纵子的 rrnT1T2。

4）外源基因的翻译调控——强化基因的翻译水平：转录产生的 mRNA 要与核糖体结合之后才能翻译产生蛋白质。从翻译的角度考虑，外源基因 5′端与核糖体结合位点（ribosome binding site，RBS）的序列强烈地影响翻译起始的效率。RBS 主要指位于翻译起始密码子上游的 5 ~ 8 个碱基（Shine Dalgarno，SD）序列、SD 序列与起始密码子之间的距离以及起始密码子和终止密码子本身的序列。

其中，由于核糖体 16S rRNA 的 3′端序列为 3′…UCCUCC…5′，因此，具有 UAAGGAGG 或 AAGGA 等碱基的 SD 序列可以与 16S rRNA 序列完全互补，具有最好的翻译效率。SD 序列与起始密码子 AUG 之间的距离通常为 5 ~ 13bp，最优距离为 7 ~ 8bp。在大肠杆菌中，起始密码子 AUG 的翻译效率远远高于 GUG 和 UUG。与此类似，终止密码子的序列也对翻译效率具有显著的影响。研究表明，UAAU 是大肠杆菌中效率最高的终止密码子，而 UGA 和 UAG 的终止效率则远远低于 UAAU。

5）融合表达策略——强化外源蛋白的活性与稳定性以及简化蛋白的回收与纯化：为了进一步提高外源蛋白在受体细胞中的表达活性或稳定性，还可将外源基因与受体菌自身的蛋白质编码基因，或另一个外源基因，或一段标签基因拼接在一起，并作为一个开放型阅读框架进行表达。由这种杂合基因表达的蛋白质称为融合蛋白。在这种融合蛋白结构中，通常引入的融合基因位于 N 端，异源蛋白位于 C 端，当然有时异源蛋白也位于 N 端。由于受体蛋白的存在，融合蛋白往往能在胞内形成良好的空间构象，且大多具有水溶性，其稳定性也能获得较大提高，尤其是对分子质量较小的多肽效果更佳。能够促进异源蛋白的可溶性表达、提高表达活性或稳定性的常用融合蛋白包括谷胱甘肽转移酶（GST）、麦芽糖结合蛋白（MBP）、硫氧还原蛋白（TrxA）、泛素蛋白（Ubi）等。外膜蛋白（OmpF）的融合表达可以促进异源蛋白的分泌。透明颤菌血红蛋白的融合表达可以提高目的蛋白的活性和稳定性。

此外，利用受体蛋白成熟的抗体、配体、底物等进行亲和层析，融合表达的异源蛋白还可以快速实现分离纯化。具有这种功能的融合蛋白或多肽包括 β-半乳糖苷酶（LacZ）、Poly-Ser/Poly-His 等标签序列（Ser-tag，His-Tag）以及金黄色葡萄球菌蛋白 A（SAPA）等。绿色荧光蛋白（GFP）与异源蛋白的融合表达则可以实现高通量的检测和筛选。通过在 DNA 水平上人工设计引入蛋白酶切割位点或化学试剂特异性断裂位点，就可以在体外从纯化的融合蛋白分子中释放回收异源蛋白。

6）理想的表达载体还需要考虑的其他问题：对于理想的表达载体，还应该具有合适的多克隆位点，便于目的基因的插入。合适的筛选标记也不可或缺，以便于目的重组子的高效筛选，通常采用耐药性标记，如氨苄青霉素抗性（Amp^r）、卡那霉素抗性（Kan^r）、氯霉素抗性（Cm^r）、四环素抗性（tet^r）等。近年来，绿色荧光蛋白（GFP）标签的应用也越来越广泛。

9.3.2 异源蛋白在酵母中的重组表达

酵母是最简单的真核细胞。采用酵母作为受体细胞，可以对目的蛋白进行糖基化修饰和其他翻译后修饰，并对目的蛋白进行分泌表达，易于实现分离纯化，因此非常适用于医用真核生物蛋白的表达。鉴于酵母细胞的重要性，本节专门对异源蛋白在酵母中的重组表达要点进行了叙述。

酵母的基因工程操作与原核细胞类似，可利用不同的载体来完成。酵母表达载体的特征与原核生物载体相似：携带真核生物启动子序列；具有真核生物转录和终止信号；携带真核生物筛选标记，转录 mRNA 的多聚腺苷酸序列等。然而，从技术上说，真核生物细胞重组 DNA 比原核细胞困难，因此，酵母细胞内基因的克隆表达也具有一些特征。目前已经研究出多种酵母细胞内基因的克隆表达方法，常用的有穿梭质粒法、大肠杆菌突变互补法等。

穿梭质粒（shuttle vector）指质粒载体上含有在某种细菌和酵母中起作用的选择性标记和 DNA 复制起点。应用穿梭质粒，基因的克隆重组操作可以非常方便地在细菌中进行，构

建好的质粒载体再转入酵母细胞中进行表达。重组 DNA 技术在酵母上的第一个突破就是既能在大肠杆菌中复制，又能在酵母中复制的穿梭质粒的成功构建。

酵母基因工程的另一个重要突破就是在酵母中发挥作用的遗传标记的获得。原核细胞中常选用各种耐药性标记来进行基因的克隆重组，而在酵母细胞体系，则发展了一系列营养缺陷型互补筛选方案，可以通过一些氨基酸（如组氨酸、亮氨酸）或核苷酸的添加来筛选突变体。

由于酵母菌的基因组相对较小，对其进行同源重组操作实现外源基因的定向插入也非常简单。这样经过进化的基因突变就可以准确地整合到酵母的基因组中，并稳定地遗传给子代细胞。

最常见的酵母受体细胞包括酿酒酵母表达系统以及巴斯德毕赤酵母表达系统等。用于酿酒酵母的表达载体主要有 3 种：游离或质粒型载体 YEp，整合型载体 YIp，酵母人工染色体 YAC。其中，游离型载体被广泛应用于异源蛋白的胞内和胞外表达。

9.4 利用重组微生物生产细胞代谢产物

9.4.1 重组微生物生产细胞代谢产物的形式

重组微生物不仅应用于重组蛋白（酶）的大规模表达与合成，还广泛应用于各种目的代谢产物的大量合成与生产。目的代谢产物既可以是胞内产物，也可以分泌到胞外；既可以与细胞的生长耦合，也可以与细胞的生长不直接相关；既可能对细胞的生理形态和功能具有抑制和毒害作用，也可能仅消耗少量的营养、前体与能量，从而没有显著的影响。与传统的“化工厂”一样，“细胞工厂”应用多种多样的代谢途径，可以生产各式各样的代谢产品。

从目的代谢产物合成的技术路线来看，重组微生物大量合成目的产物，一方面可以通过重组载体（通常是质粒）表达目的产物基因、代谢途径基因或调控基因，另一方面，则是对宿主细胞本身进行改造，拓展或阻断某些代谢途径，强化或弱化某些调控基因，从而实现大量合成终产物的根本目的。

结合一些实际的研究、设计与生产实例，对重组微生物合成各种目的代谢产物的思路、方法、应用与问题等分别进行介绍。

9.4.2 利用重组大肠杆菌生产可生物降解材料

聚 3-羟基烷酸酯（poly-3-hydroxyalkanoate，PHA）是一类具有生物相容性、光学活性、热塑性和完全生物降解性等特性的生物高分子，能被自然界存在的微生物如细菌、霉菌（真菌）和藻类作用而降解，具有巨大的应用前景。

目前，大约有 150 种不同的 PHA 单聚物或共聚物被鉴定。其中，由含有小于或等于 6 个碳原子的单体组成的中短链 PHA 因为具有和商用塑料相似的理化性质而被研究得最多。不同于最普遍存在且被研究得最深入的聚 3-羟基丁酸酯（PHB），一些由 3-羟基丁酸（3HB）和其他单体如 3-羟基丙酸（3HP）、3-羟基戊酸（3HV）、3-羟基己酸（3HHx）等共聚得到的共聚物在柔软性等方面有很大改善，极大拓宽了 PHA 的可应用领域。

要得到 PHA 共聚物，现在最常见的做法是使用混合碳源进行微生物发酵。混合碳源一般由葡萄糖等糖类及 3HB 以外的单体的前体物质，如 3HP 的前体——丙酸、3HV 的前

体——戊酸、3HHx 的前体——己酸等构成。而由于这些前体物质对细胞的毒害作用及相对于糖类的价格过高问题，使得通过混合碳源生产 PHA 共聚物的工艺遇到困难，阻碍了 PHA 共聚物的实用化。寻找或构建能够直接利用单一廉价碳源如葡萄糖生产 PHA 共聚物的菌株就变得很有必要。如图 9-7 所示，PHA 生产菌从胞外摄取碳源，利用碳源在体内通过自身或者外源的单体供给途径合成各种羟基酯酰辅酶 A，然后通过 PHA 合成途径合成 PHA。单体供给途径及 PHA 合成途径可以是菌体本身存在的或者由外源引入。寻找本身存在这些代谢途径的微生物是一种办法，而在微生物中构建外源的代谢途径则是另外一种选择。

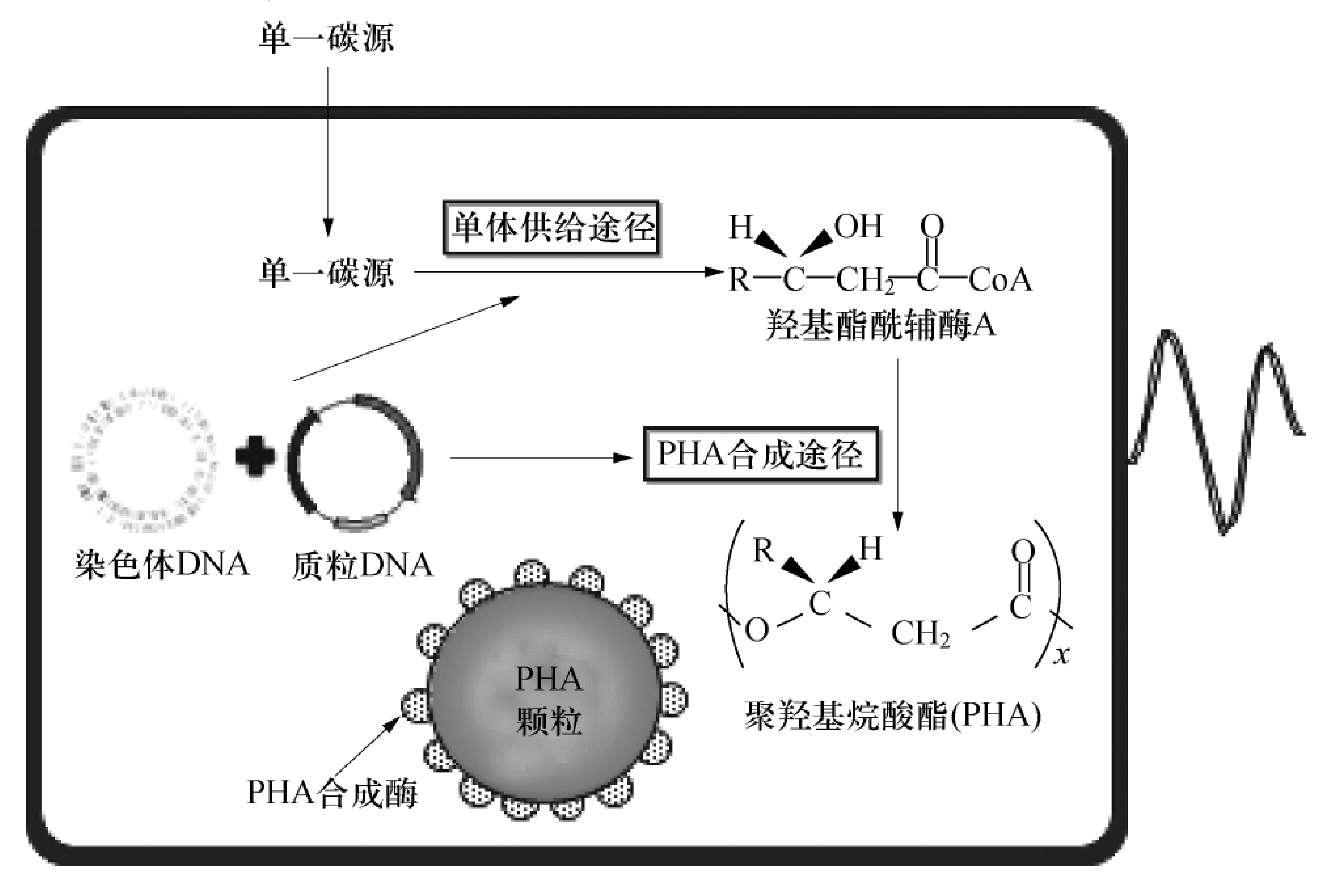


图 9-7　利用微生物由单一碳源合成 PHA 示意图

一些研究者就通过在 PHA 生产菌中构建异种菌的单体供给代谢途径，从而使其能够利用单一的碳源，不添加前体物质得到共聚物。到目前为止，在 Poly(3-hydroxybutyrat e-*co*-3-hydroxypropionate)(P(3HB-*co*-3HP)) 的生产中，需要在培养基中添加 3-羟基丙酸或者其他相关的化合物作为 3HP 单体的前体物质。因此，研究者通过修饰 *R. eutropha* 这株 PHB 生产菌的代谢途径，在细胞内表达外源基因，合成能替代外加前体物质作用的 3HP-CoA，再通过 PHA 合成途径得到 P（3HB-*co*-3HP）共聚物。将来源于 *C. aurantiacus* 的 *Mcr*（丙二酰辅酶 A 还原酶基因）和 *Acs*（3-羟基丙酰辅酶 A 合成酶基因）在 *R. eutropha* 中表达，成功构建了由乙酰辅酶 A 起始的 3HP-CoA 单体供给途径，再通过菌体自身的 PHA 合成途径，最终由单一碳源得到 P（3HB-*co*-3HP）共聚物（图 9-8）。如图 9-8 所示，不仅可以在 PHA 生产菌中引入单体合成途径，也可以在本身不含有 PHA 合成途径的菌（如大肠杆菌）中通过表达外源的 PHA 操纵子，构建外源的 PHA 合成途径，与外源的单体合成途径一起完成 PHA 共聚物的生物合成。

PHB 是 PHA 中研究得最为透彻的一种。由于其同时具有可完全生物降解性、生物相容性、抗凝血性、压电性及光学活性等，在材料领域和医药领域受到科研工作者的广泛重视。然而，产 PHB 的野生菌株培养基的组成复杂、原料昂贵，在好氧发酵过程中，需要强化通气或搅拌，造成高能耗，而通富氧的成本更加可观，另外，PHB 产品的回收成本高。由于 PHB 颗粒是胞内产物，要利用 PHB，首先必须将它从细胞内分离提取出来。根据对细胞结构的分析可知，细胞破碎的主要阻力来自于细胞壁致密的肽聚糖结构。PHB 生产中所面临

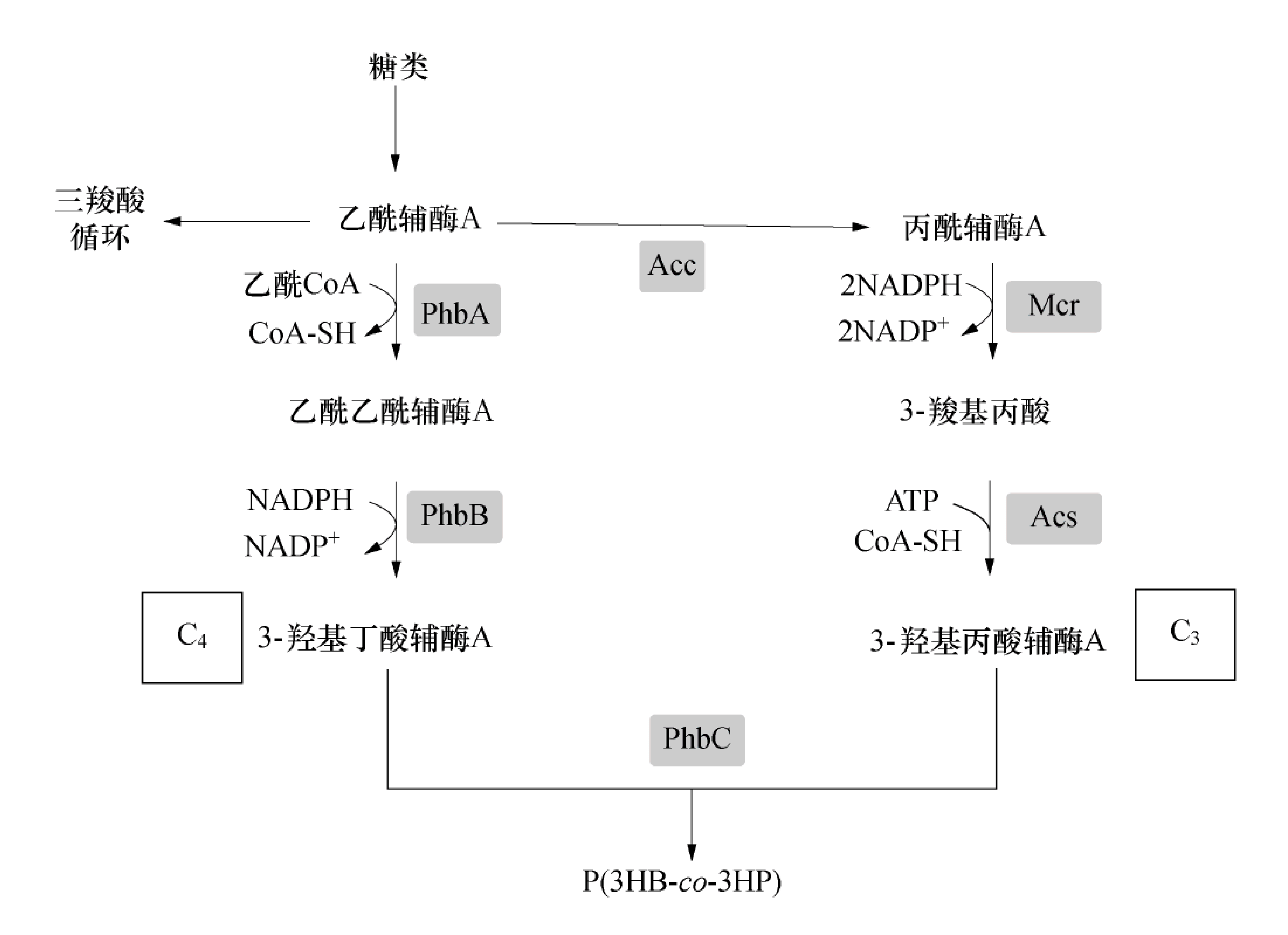


图 9-8　在 *R. eutropha* 中由单一碳源合成 P（3HB-*co*-3HP）共聚物的人工代谢途径

Acc，乙酰 CoA 羧化酶；Acs，3-羟基丙酸辅酶 A 合成酶，来源于 *C. aurantiacus*；PhbA，β-酮硫解酶；PhbB，NADPH 依赖乙酰乙酰辅酶 A 还原酶；PhbC，PHA 合成酶；Mcr，丙二酰辅酶 A 还原酶，来源于 *C. aurantiacus*.

的细胞破碎和产物回收问题，也是所有其他胞内产物后处理过程中所面临的共同问题。在许多生物产品的生产成本中，分离纯化产品的成本占总成本的 60% ~90% 。

随着基因工程技术的发展，重组 DNA 技术已逐渐被引入 PHB 的生产。基因工程菌具有生长迅速，培养基原料来源广，可利用廉价原料和废弃物来大量产生 PHB，从而降低生产成本等突出优点，因此受到人们的关注。基因工程大肠杆菌的代谢途径中只有合成 PHB 的酶，没有分解 PHB 的酶，故 PHB 在菌中只能合成，不能分解，有利于获得高分子量和高含量的 PHB。目前，引入真养产碱杆菌的 PHB 合成酶基因来生产 PHB 的重组大肠杆菌已经获得成功。为从基因水平上解决产 PHB 菌株的细胞破壁、胞内产物释放及降低分离提取成本问题，可以采用将 λ 噬菌体裂解基因（*SRRz*）引入 PHB 生产的新思路。*SRRz* 可以编码裂解细菌细胞壁的几种酶。其中，*R* 和 *Rz* 基因产物可以分解细胞壁的肽聚糖及切割肽聚糖寡糖间以及肽聚糖与胞壁外膜间的交联，*S* 基因产物则可以增大细胞膜的通透性，使 *R* 和 *Rz* 基因产物可以透过细胞膜到达细胞壁，从而裂解细胞。但直接引入 *SRRz* 基因时，在细胞培养过程中裂解基因的全部表达，将导致细胞在产品大量积累之前就破裂，不能获得细胞的高密度培养及 PHB 的高产量。为解决此矛盾，有学者采用了 *S* 基因琥珀突变（S^-）的克隆策略，使 *S* 基因产物终止编码。这样，*R* 和 *Rz* 基因产物就不能通过细胞膜到达细胞壁，继而裂解细胞壁。只当利用其他手段（如某种化学方法）改变细胞膜的通透性后，细胞才会裂解，从而实现细胞破壁的可控性。按照上述克隆策略，从 λ 噬菌体 cI Sam 857 中克隆得到 1.4kb 的 S^-*RRz* 基因，连接质粒，转化宿主，最终实现了 S^-*RRz* 在重组大肠杆菌中的成功表达，继而实现了产 PHB 重组细胞的高效可控破壁。

透明颤菌血红蛋白（*Vitreoscilla* Hemoglobin，VHb）是由革兰阴性专性好氧菌——透明颤菌于微氧条件下合成的一种类似于人血红蛋白的胞内可溶物质，它能够从分子水平上提高透明颤菌血红蛋白基因（*Vitreoscilla* hemoglobin gene，*vgb*）克隆菌对氧气的利用能力，促进

细胞生长和产物合成，提高发酵过程中目的产物的产量和收率，从而节省了加入氧载体或增大通气搅拌的设备费及附加的通富氧或纯氧的投资。为从基因水平上解决 PHB 高密度生产中的供氧困难，可在 S^- *RRz* 和 PHB 合成基因（*phbCAB*）共表达的基础上，进一步引入 *vgb* 基因，在同一大肠杆菌细胞中同时实现 3 种外源基因的共表达。为此，分别设计如下 3 种克隆策略将 *vgb* 基因引入重组细胞：

策略一是将 *vgb* 基因与 S^- *RRz* 基因和 *phbCAB* 基因在同一质粒上共表达；策略二是将 *vgb* 基因转入另外一个相容性质粒中，进行双质粒共表达；策略三则是将 *vgb* 基因采用同源基因交换法直接插入宿主菌的染色体中，与染色体遗传信息一起进行单拷贝表达，而 S^- *RRz* 基因和 *phbCAB* 基因则由质粒携带转入该重组宿主。按照这三种不同的策略，以不同菌株为宿主，成功构建了 17 株产 PHB 的重组菌株，并最终筛选获得了同时具有高溶氧利用能力、细胞壁可控裂解能力和 PHB 高产能力的基因工程菌株——重组 *E. coli* VG1（pTU14）。在 VG1（pTU14）细胞中，*phbCAB* 基因与 S^- *RRz* 基因由新建重组质粒 pTU14 携带转入宿主菌，*vgb* 基因则利用同源基因交换法直接插入宿主菌 VG1 的染色体，最终实现了 3 种外源基因在 VG1（pTU14）中的同时克隆和表达。

同时携带 3 种外源基因的重组大肠杆菌 VG1（pTU14）的示意图如图 9-9 所示。

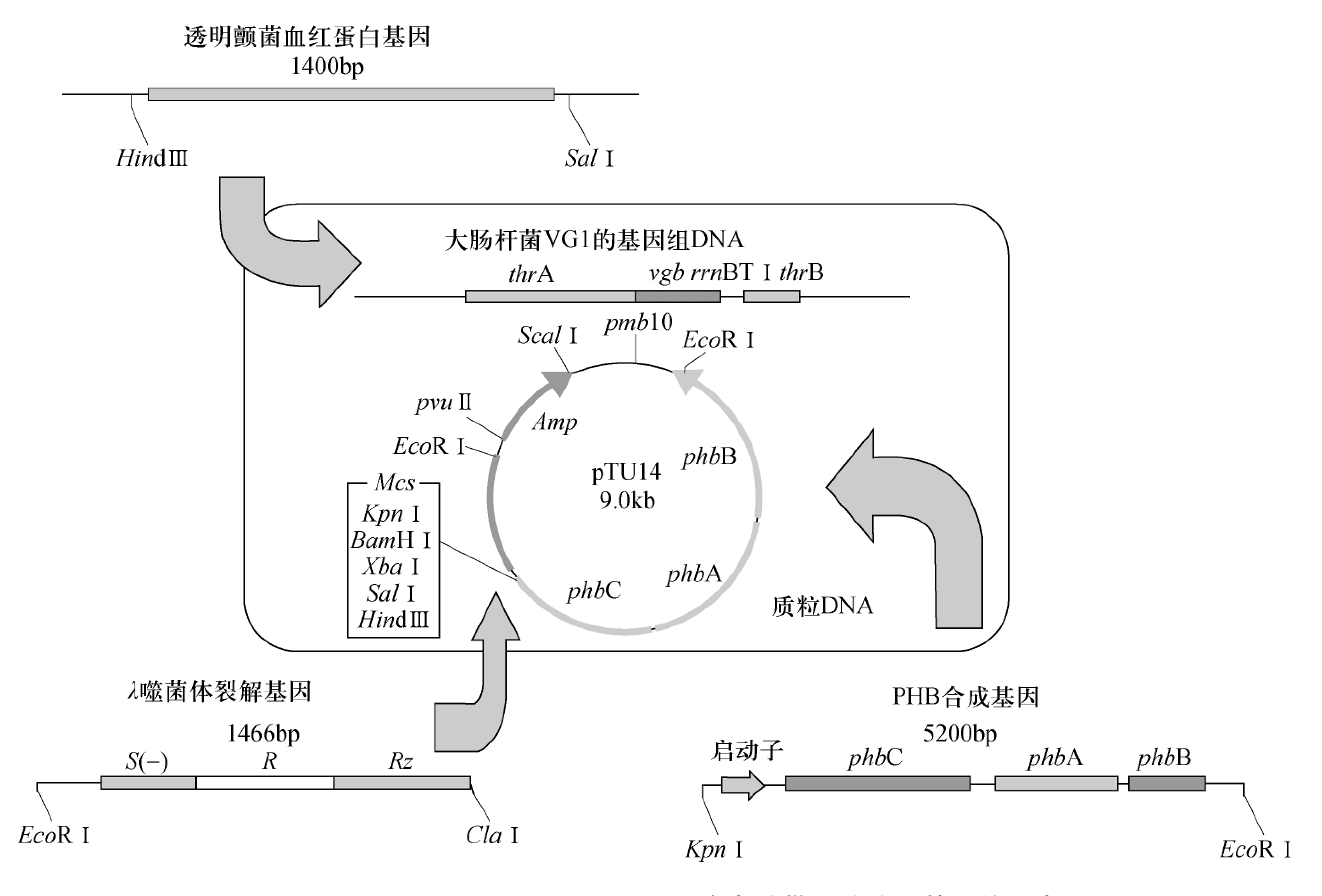


图 9-9　重组 *E. coli* VG1（pTU14）细胞内携带三种外源基因的示意图

电镜分析、气相色谱分析和显微观察的结果均表明，*phbCAB* 基因可以在 VG1（pTU14）中成功表达，且产物 PHB 的积累与菌体生长基本线性相关。随着培养过程的进行，VG1（pTU14）细胞内积累的 PHB 逐渐增多，细胞的体积也随之增大。当培养到 48h 时，PHB 几乎充满整个细胞，同时细胞形态由最初的短杆状胀大成近似椭球状，如图 9-10 所示。

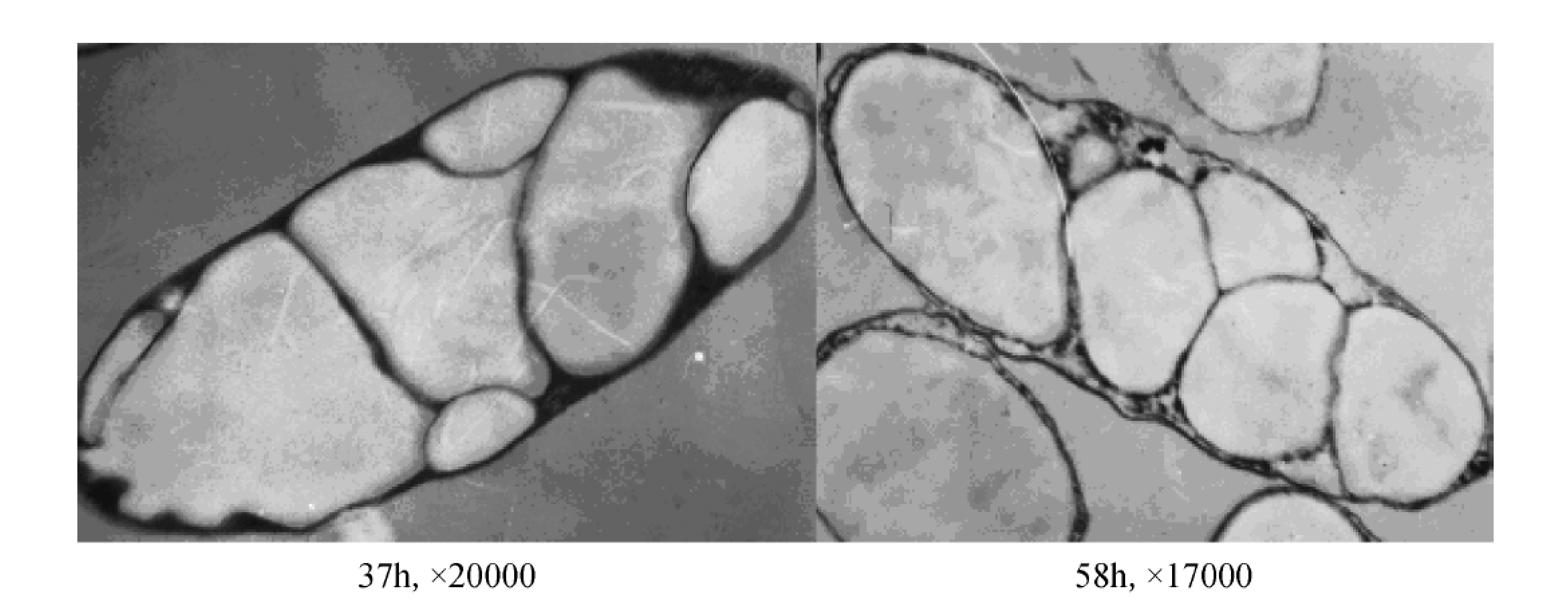


图 9-10　重组大肠杆菌 VG1（pTU14）细胞中积累的白色 PHB 颗粒

VG1（pTU14）中 S^-RRz 基因的表达不需加入昂贵的 IPTG 进行诱导。采用 *S* 基因产物功能模拟物处理细胞，可以使细胞壁有效裂解（图 9-11）。裂解处理后，PHB 产品纯度可以提高约 10 个百分点。进一步研究表明，在 VG1（pTU14）的培养末期，PHB 颗粒在细胞内的大量积累同样会改变细胞膜的通透性，使细胞自动裂解，而不需外加任何其他的 *S* 基因产物的模拟物，这就有可能进一步简化 PHB 的分离提取步骤。

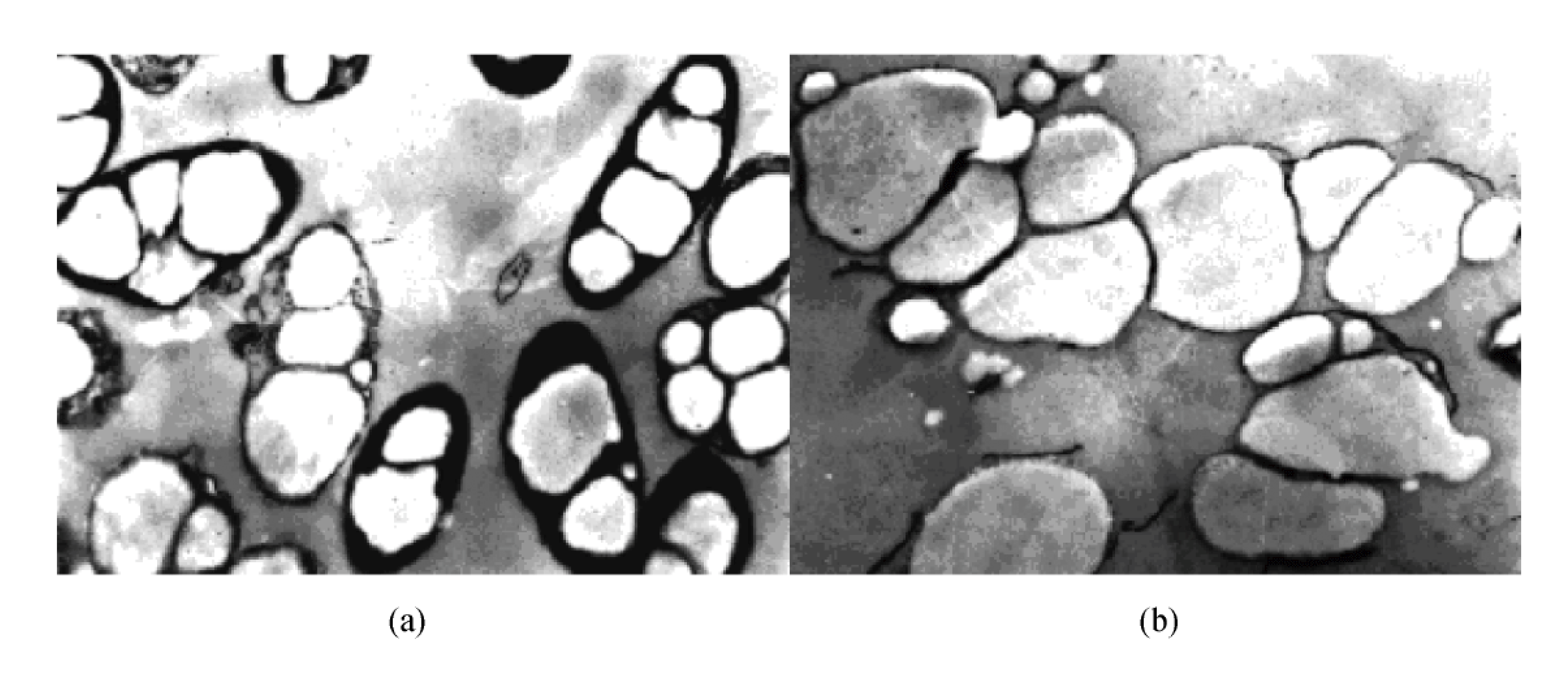


图 9-11　重组大肠杆菌 VG1（pTU14）细胞采用裂解处理前后的电镜观察

（a）诱导裂解前（×6000）；（b）诱导裂解后（×10000）

CO 差光谱分析表明，*vgb* 基因在 VG1（pTU14）中能够成功表达，且其表达量受溶氧水平的调控。由 *vgb* 基因成功表达所编码的 VHb 可以同时促进菌体细胞的生长和 PHB 产品的积累，且当溶氧水平较低，VHb 的表达量较高时，这种促进作用更为明显。进一步研究表明，VHb 能够降低 VG1（pTU14）细胞的临界氧浓度，保持其在较低溶氧水平下的细胞活性。更有意义的是，VHb 可以提高重组细胞的体积氧传递系数 K_La，尤其是贫氧条件下的 K_La，从而使重组细胞具有更强的贫氧耐受能力，因此在发酵过程中不需通入富氧或纯氧。

综上所述，通过 PHB 合成基因（*phbCAB*）、λ 噬菌体裂解基因（S^-RRz）和透明颤菌血红蛋白基因（*vgb*）在重组大肠杆菌 VG1（pTU14）中的同时引入，不仅实现了目的代谢产物 PHB 在重组大肠杆菌中的大量积累合成，而且成功解决了 PHB 生产中原料成本和分离回收成本高以及供氧矛盾等问题，实现了 PHB 的高密度、高表达生产并大幅度降低了生产成本。该研究策略也是采用 λ 噬菌体裂解基因和透明颤菌血红蛋白基因作为功能调控基因，辅助胞内产物 PHB 合成及后续分离纯化的成功范例。

9.4.3　利用重组微生物生产透明质酸

透明质酸（hyaluronic acid，HA）是一种广泛存在于人和动物体内的大分子酸性黏多糖，由 *D*-葡萄糖醛酸（*D*-glucuronic acid，GlcA）和 *N*-乙酰葡萄糖胺（*N*-acetyl-*D*-glucosamine，GlcNAc）重复单位构成线性直链结构，分子质量能够达到 10^6 ~ 10^7Da。

透明质酸以其独特的分子结构和理化性质在机体内显示出多种重要的生理功能，如润滑关节、调节血管壁的通透性、调节蛋白质/水电解质扩散及运转、促进创伤愈合等。另外，存在于皮肤中的 HA 可以改善皮肤营养代谢，使皮肤柔嫩、光滑、去皱、增加弹性、防止衰老，在保湿的同时又是良好的透皮吸收促进剂，因此 HA 又被称为抗衰老因子。因 HA 这些重要的生理功能，其被广泛应用于临床、化妆品以及保健品领域。

商用透明质酸的最初工业生产方法是以雄公鸡的鸡冠为原料的生物组织提取法，由于原料来源有限而使得 HA 产量低，产品纯化成本高，并存在禽类过敏等问题，使得 HA 的生物组织提取法受到多方面的限制。早在 1937 年，研究人员就发现链球菌（*Streptococcus*，对人或动物具有致病性）可产生 HA。后续的大量研究结果证明，某些种属的链球菌在一定的环境条件下，能同化吸收葡萄糖或其他碳源，以代谢产物形式产生 HA。以工业化生产为目的的 HA 发酵研究始于 20 世纪 80 年代的日本，但链球菌发酵生产的 HA 产品存在的安全隐患促使研究者们将目光进一步投向重组微生物。

1. 重组枯草芽孢杆菌生产透明质酸　枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）作为一种成熟的工业宿主菌，被广泛地应用于各种化学品（氨基酸、维生素等）及酶制剂（蛋白酶、淀粉酶等）的微生物发酵生产中。利用 *Bacillus* 进行 HA 的工业发酵有诸多好处：*Bacillus* 能够将产物分泌到胞外，有利于大量合成产物；培养基经济可行；不分泌毒物；不含有能够降解 HA 的 HA 酶；基因组信息清晰，基因操作工具齐全；作为研究较多的革兰阳性菌，有利于表达 HA 合成酶。

Novozyme 公司 2005 年克隆了马链球菌（*Streptococcus equisimilis*）的透明质酸合成酶（seHAS）及 *Bacillus* 中合成 HA 前体所需的酶基因 *hasB*（*tuaD*）、*hasC*（*gtaB*）、*hasD*（*gcaD*），通过研究 *Bacillus* 中 HA 合成的代谢途径，构建了一系列 HA 合成操纵子，并导入到基因组的 *amyE* 位点，进行 HA 的基因重组代谢合成（图 9-12）。结果表明，在 *Bacillus* 中重组合成 HA 时，单表达 *hasA* 基因的 HA 产量相当低；共表达 *hasAB* 则大大提高了 HA 的产量，与 *hasABC* 共表达的产量相当，表明 UDP-葡萄糖脱氢酶（HasB）是 HA 合成途径中的关键酶。Novozyme 公司进一步将 *hasABC* 共表达的菌株 *Bacillus subtilis* RB161 在 3L 的发酵罐中，以蔗糖为碳源进行发酵培养，并对发酵过程中的 HA 产量、发酵液黏度和溶氧值进行了检测。在 25h 时，HA 产量即接近达到最大值，与链球菌发酵法的产量相当。发酵后的 HA 分子质量通过凝胶过滤层析分析，结果大致为 1.1 ~ 1.2MDa 的范围，与目前商业上其他来源的 HA 分子质量相当。

2. 重组大肠杆菌生产透明质酸　2008 年有学者进一步探讨了在革兰阴性重组大肠杆菌中发酵生产 HA 的可行性，包括操纵子选择、稀有密码子效应、细菌生长抑制、HA 产量和分子质量大小等。Yu 一方面克隆了酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）的 HA 合成酶基因（*sphasA*）；另一方面通过 Assembly PCR 人工合成了剔除大肠杆菌中稀有密码子的马链球菌 HA 合成酶基因（*ssehasA*）；进一步克隆了大肠杆菌中 HA 合成的代谢途径基因 *hasB*（*ugd*）、*hasC*（*galF*）、*hasD*（*glmU*）并构建了一系列的操纵子，以大肠杆菌 *E. coli* Top10 为宿主，

以葡萄糖为碳源，在 LB 培养基中摇瓶发酵生产 HA（图 9-13）。结果发现，重组表达 *spA*、*spAB*、*spABC* 等基因的重组大肠杆菌 72h 时分别积累了 5.7、7.6、95.9mg·L^{-1}的 HA，而以 *sseA*、*sseAB*、*sseABC* 共表达的大肠杆菌则分别积累了 27.8、203.5、189.6mg·L^{-1}的 HA，证实了人工合成的马链球菌 HA 合成酶的高效性，以及 *hasB* 基因共表达对 HA 重组合成的重要性。*sseAB* 及 *sseABC* 共表达菌株合成的 HA 分子质量分布在 0.45～3.1MDa 的范围内。由于大肠杆菌为革兰阴性菌，在摇瓶发酵生产 HA 的过程中，可观察到明显的细菌生长与 HA 合成酶表达的竞争性抑制，体现了用大肠杆菌表达 HA 合成酶、生产 HA 的弱点。与重组枯草芽孢杆菌不同，产 HA 的重组大肠杆菌在特殊的固体平板上呈现半透明菌落形态，其反相照片如图 9-14 所示。

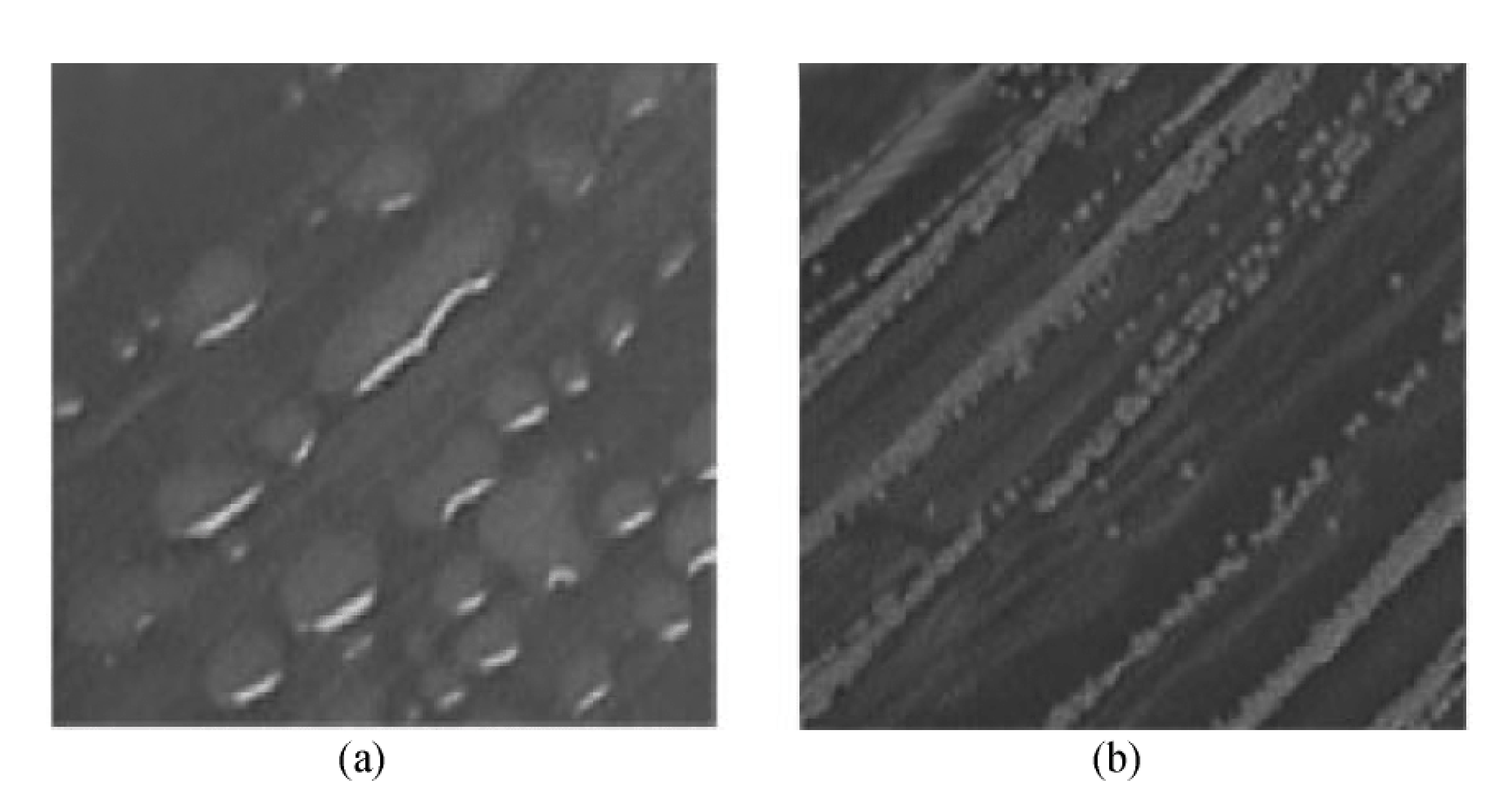


图 9-12　产 HA 重组枯草芽孢杆菌在固体平板上形成黏性菌落形态

（a）矿物培养基平板上以葡萄糖为单一碳源的产 HA 重组 *B. subtilis* RB161 形成黏性菌落；（b）同样条件下生长的野生 *B. subtilis* 的菌落形态

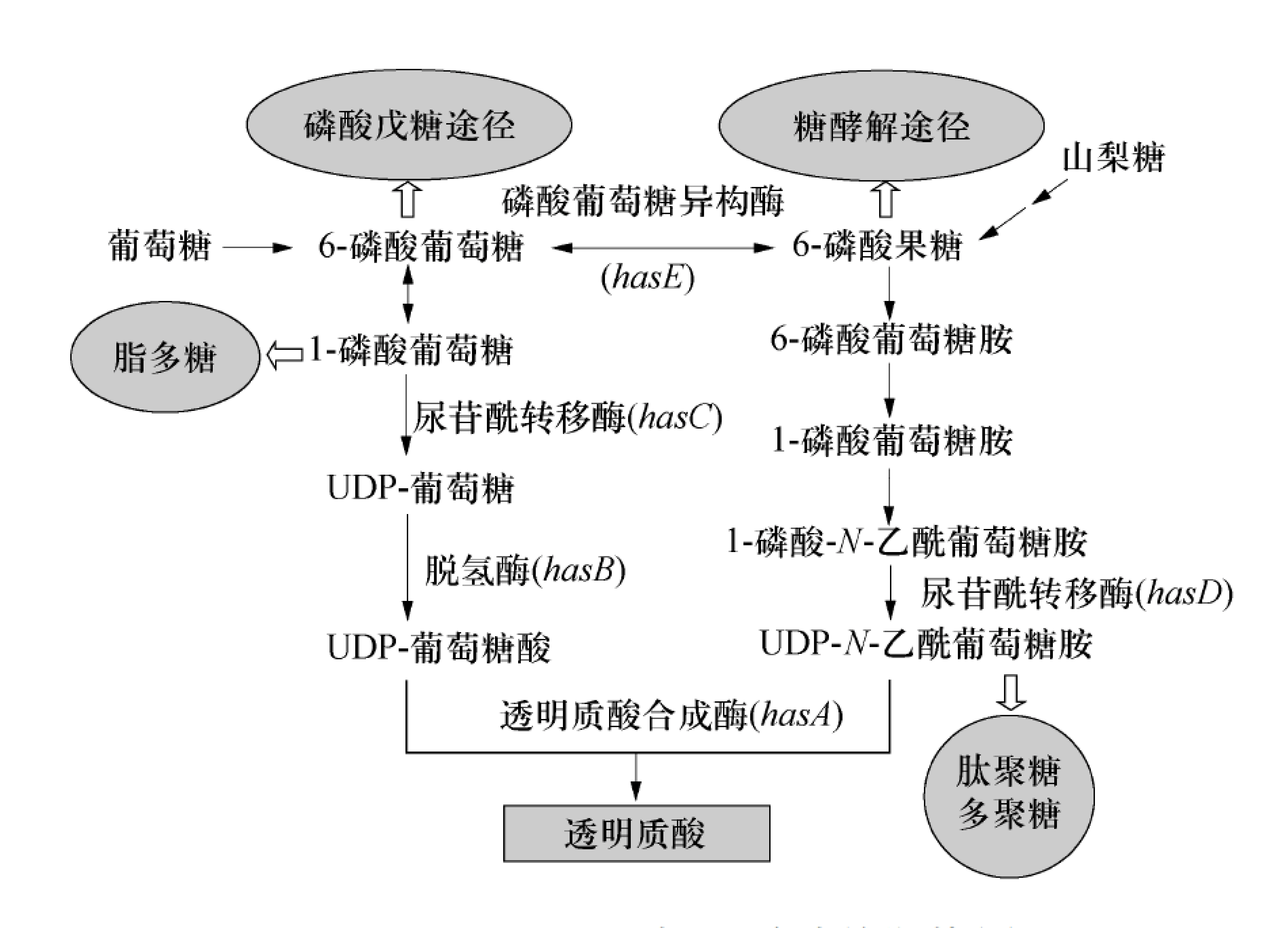


图 9-13　重组 *E. coli* 中 HA 合成的代谢途径

9.4.4　利用重组大肠杆菌生产胰岛素

胰岛素（insulin）是由胰岛细胞分泌的蛋白质激素，它由分别含有 21 个和 30 个氨基酸残基的 A 链和 B 链两条多肽链组成。胰岛素含有 3 个二硫键，其中两个连接 A 链和 B 链，

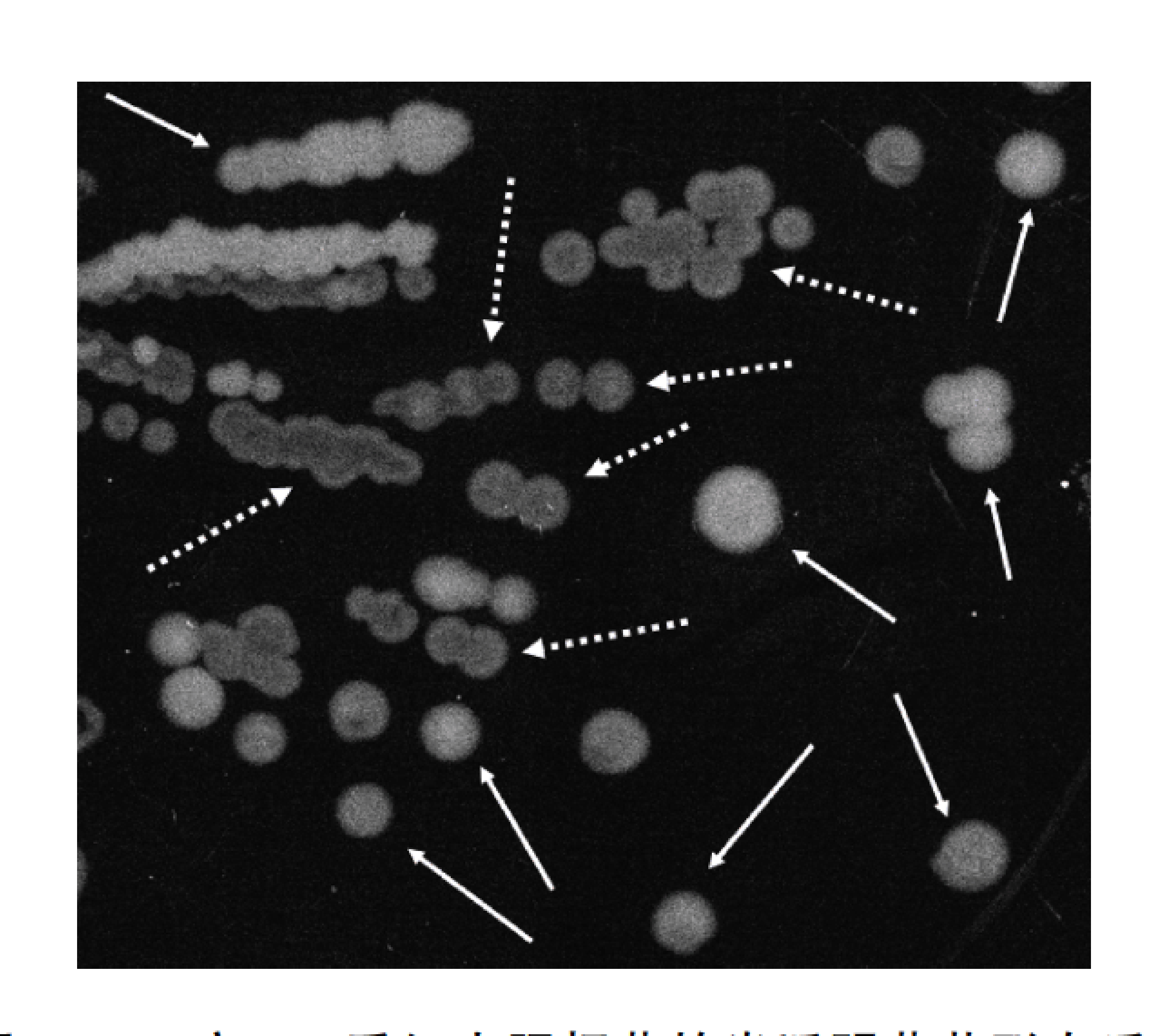


图 9-14　产 HA 重组大肠杆菌的半透明菌落形态反相图

实线箭头指向的致密白色菌落是不产 HA 的菌株；虚线指向的半透明菌落是产 HA 的重组大肠杆菌

一个在 A 链内，帮助胰岛素形成正确的构象和生物活性。研究发现，在体内有活性的双链胰岛素实际上是由一条多肽链合成的，A 链的 N 端和 B 链的 C 端之间有一段被称为 C-肽的连接肽，这条单链的多肽即为胰岛素原（proinsulin）。胰岛素原在内质网中合成后，被运输到高尔基体中，经过折叠、硫硫配对和分泌，最后由类似胰蛋白酶和羧肽酶 B 的专一蛋白酶加工去除 C 肽，形成两条链的胰岛素，并释放到血液中。胰岛素是生物体内唯一降低血糖的激素，它可以促进糖的利用与糖元的合成，抑制糖异生，还能促进脂肪和蛋白质的合成，并抑制其分解。1921 年研究人员首次从狗胰腺中成功获得了胰岛素，并于翌年投入到临床应用，多年来其挽救了无数糖尿病患者的生命，因此胰岛素被人们誉为 20 世纪最为重要的生物工程药品之一。

胰岛素根据来源与合成途径可以分为 3 类：第一类是动物胰岛素，主要从动物的胰腺中提取纯化得到，比如猪胰岛素、牛胰岛素；第二类是将猪胰岛素第 30 位丙氨酸，置换成与人胰岛素相同的苏氨酸，即为半合成人胰岛素；第三类是生物合成人胰岛素，即利用生物工程技术，利用微生物发酵生产获得高纯度、与人胰岛素氨基酸序列及生物活性完全相同的重组人胰岛素。1977 年研究人员首先报道了利用重组微生物表达生产鼠胰岛素，而 1981 年利用重组大肠杆菌成功表达了人胰岛素，使其成为第一个基因工程药物。自 1982 年美国公司生产的重组人胰岛素上市以来，随着生物工程技术的发展以及重组人胰岛素的生物安全性优势，利用重组微生物生产的人胰岛素已大多取代了传统的动物胰岛素，成为市场的主力。

目前市场上重组人胰岛素主要是通过重组大肠杆菌和重组酵母菌两套系统生产：大肠杆菌结构简单，基因背景清晰，繁殖速度快，操作简单，是 20 世纪基因工程技术诞生以来的首选外源基因表达系统。但是利用大肠杆菌表达的人胰岛素基本以包涵体的形式存在，需要经过复杂的体外处理和加工过程才能得到有活性的人胰岛素。相比而言，重组酵母菌则是一套更加有效的真核基因表达系统，不易形成包涵体，其缺点在于发酵和表达水平不高，不利于高密度、大规模发酵培养。

利用重组大肠杆菌系统表达人胰岛素主要有 2 条途径：第一条是 A、B 双链重组表达途径，即通过基因工程手段在大肠杆菌中分别表达 A 链和 B 链，经蛋白酶处理，纯化后通过一定方法在体外重组成活性双链胰岛素。如研究人员利用大肠杆菌密码子偏好性、热诱导启

动子和融合蛋白表达等策略在大肠杆菌中高效表达了人胰岛素 A、B 双链，表达总量占可溶性蛋白含量的 60% ~80%；第二条是胰岛素原表达途径，即在大肠杆菌中重组表达人胰岛素原的基因或其类似物，通过后期胰蛋白酶、羧肽酶 B 等处理去除 C 肽，得到有活性的双链人胰岛素。

重组酵母菌表达系统主要包括酿酒酵母（*S. cerevisiae*）表达系统和巴斯德毕赤酵母（*P. pastoris*）表达系统。早期研究得较多的是酿酒酵母系统。1987 年研究人员在酿酒酵母中高效表达了“超氧化物歧化酶 – 人胰岛素原”融合蛋白，含量高达 100mg · L^{-1}，但表达产物基本为不可溶的包涵体，经复性后可得到有活性的胰岛素。将单链猪胰岛素前体基因与 α 交配因子前导顺序基因转化酿酒酵母，可表达单链前体并分泌到培养基中，前体在纯化后通过胰蛋白酶的转肽作用可以转变成可结晶的人胰岛素，并具有全部活性，最终收率为 25mg · L^{-1}。

毕赤酵母是一类可以以甲醇为唯一碳源的酵母（也称为甲醇酵母），它继承了酿酒酵母的许多优点，且作为真核表达系统，具有自身独特的优势：乙醇氧化酶（AOX1）启动子具有强诱导性和强启动性，有利于外源基因的高效诱导表达；具有强好氧生长性，可高密度发酵培养；生长快，营养要求低，培养基廉价；自身分泌的蛋白非常少，有利于后期表达产物的分离和纯化。上述种种有利因素使得基因工程胰岛素的毕赤酵母表达系统引起了人们更多的关注和研究，研究人员将含有小 C 肽（如 AKK）的人胰岛素基因与不同的前导肽序列重组后转化毕赤酵母进行分泌表达，发现能有效提高单链胰岛素原的分泌水平；与酿酒酵母相比，更适合于重组人胰岛素的高密度大规模工业化生产。将含 9 个氨基酸的间隔肽序列引入到猪胰岛素前体（PIP）基因的 5′端后转化毕赤酵母，发现间隔肽序列的引入有利于提高 PIP 的表达水平，融合蛋白的产量可达 40mg · L^{-1}。目前，人们正在努力对人胰岛素基因在甲醇酵母中的高密度分泌表达和对表达产物的纯化工艺进行研究，希望建立一套简便高效的人胰岛素发酵生产和纯化工艺。

9.4.5 利用重组酿酒酵母生产生物乙醇

乙醇是重要的化工原料、有机溶剂、消毒剂及饮料酒勾兑的原料。随着可再生资源的日趋枯竭，燃料乙醇是最有发展前景的可再生清洁能源之一。世界生物燃料调查报告报道，世界乙醇需求在 2030 年将达到 3000 亿升，约为 2006 年世界产量 510 亿升的 6 倍。酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）是工业上生产乙醇的优良菌株，具有容易培养、耐乙醇及抑制物、乙醇产率高等特点。2004 年世界乙醇总产量中的 80% 是由酿酒酵母 *S. cerevisiae* 利用不同碳源在厌氧条件下发酵生产的。

乙醇是酿酒酵母的葡萄糖代谢过程中无氧呼吸的产物，在它的全部生物化学反应过程中，葡萄糖经糖酵解（EMP）途径生成中间产物丙酮酸，丙酮酸脱羧生成乙醛，乙醛作为氢受体使 NAD^+ 再生，发酵终产物为乙醇。图 9-15 为酿酒酵母中乙醇的主要代谢途径。

目前，针对酿酒酵母生产生物乙醇的基因工程研究主要集中在 2 个方面。一方面是对酵母菌自身进行改造，达到提高乙醇产率或提高温度、原料、产物耐受性等目的；另一方面是通过导入外源基因等方法，在酿酒酵母细胞内耦合多糖水解等过程，使酵母菌可以直接利用更广泛、更廉价的生物质原料生产乙醇。

在对酵母菌自身进行改造方面，基于对酿酒酵母乙醇代谢途径的研究，对相关基因进行改造，可以提高糖类的利用率，提高乙醇产率。如图 9-15 所示，甘油是乙醇代谢过程中的

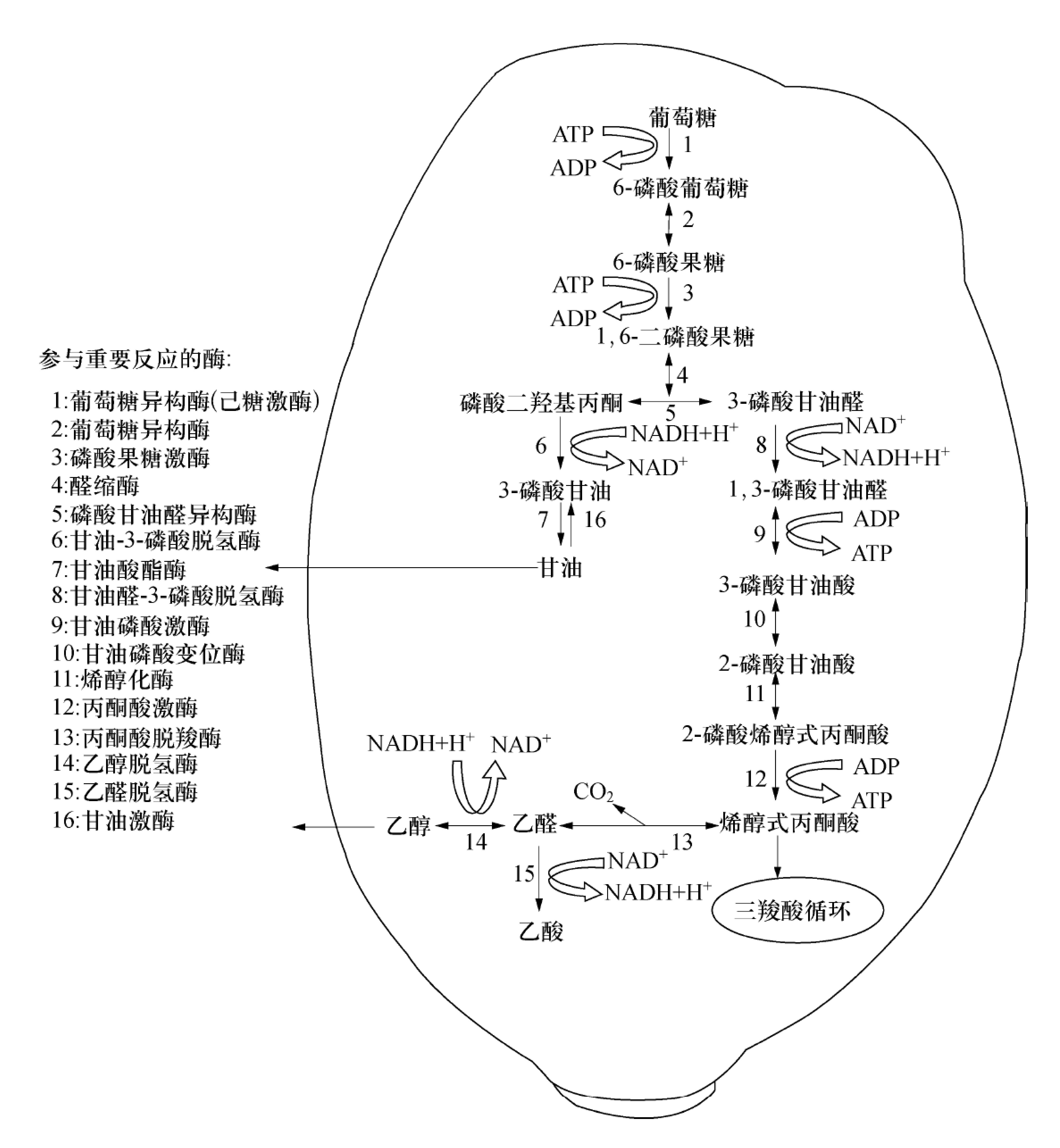


图 9-15　酿酒酵母中乙醇的主要代谢途径

主要副产物。通过缺失编码副产物甘油的通道蛋白基因 *fps*1、编码三磷酸甘油脱氢酶的基因 *gpd*1 和 *gpd*2，可以使酿酒酵母的甘油生成量降低 30% 以上，使乙醇产量提高 15% 左右。将来源于粟酒裂殖酵母的 α－半乳糖苷酶基因 *mel* 整合到酿酒酵母染色体中的甘油代谢相关 *gpd*1 基因中，重组子 *S. cerevisiae* MG1 利用蜜二糖的能力显著提高，产甘油能力下降，生长时具自絮凝能力。又如，*snf*1 基因编码的 snf1p 对起始受葡萄糖阻遏基因的转录是必需的。通过同源重组实现酿酒酵母 SY2 的 *snf*1 基因双倍体敲除，突变株在厌氧发酵试验中，乙醇产量较出发菌株提高了 8.74%。利用原生质体融合技术产生的耐热酵母细胞可以在 35℃ 和糖蜜体积质量分数 22% 的条件下生长。另外，辅酶工程也在酿酒酵母木糖代谢途径中有所应用。例如，通过增加或阻断某一条代谢途径，减少 NADPH 的旁路消耗，增加木糖代谢中可利用的 NADPH，实现在厌氧条件下的氧化是解决辅酶氧化还原平衡问题的有效方法。研究人员在表达木糖代谢相关酶的重组酿酒酵母中敲除了铵吸收的主要酶基因——NADPH 依赖型谷氨酸脱氢酶基因（*gdh*1），并通过超表达 NADH 依赖型谷氨酸脱氢酶基因（*gdh*2），或超表达 GO－GO GAT 途径谷氨酸合成酶基因（*glt*1）和谷氨酰胺合成酶基因（*gln*1），使酵母能完成铵吸收过程。结果显示，在超表达 *gdh*2 后，酿酒酵母工程菌在厌氧分批发酵中，

与出发菌株相比乙醇产量增加了8%，木糖醇的积累减少了44%。而超表达GO-GO GAT途径的*glt*1和*gln*1在碳源限量的厌氧连续发酵中，乙醇的产量提高了16%。

发酵法生产乙醇所用的天然原料，按传统方法主要分为3类：糖类、淀粉类和纤维素类物质。糖类（主要来自于制糖副产物糖蜜）可以被酿酒酵母直接转变成乙醇；淀粉类（来自于玉米、木薯、土豆等）必须首先经酶的作用水解成可发酵的单糖，进而发酵生成乙醇；纤维素类（来自于木材、农业废弃物和造纸厂废料）也必须首先转变成酿酒酵母可利用的单糖。长期以来，人们利用淀粉和糖类等发酵生产乙醇。但这些原料成本很高，大大限制了燃料乙醇产业的发展。以木质纤维素为原料生产生物乙醇，已经成为研究关注的焦点。

一方面，利用酸解或酶解的方法对木质纤维素进行预处理，可转化为大量的五碳糖（木糖和阿拉伯糖）和六碳糖（葡萄糖、半乳糖和甘露糖）。酿酒酵母可以直接利用六碳糖转为乙醇，而无法利用五碳糖。通过基因工程技术得到的重组酵母菌有望解决这样的问题。因为酿酒酵母虽然不能利用木糖，但可以利用木酮糖，因此人们将细菌中的木糖异构酶基因（*xylA*）或树干毕赤酵母中的木糖还原酶基因（*xyl*1）和木糖醇脱氢酶基因（*xyl*2）通过质粒转入酿酒酵母中，并加上适当的启动子，使之可以发酵木糖。有报道，转入*xyl*1和*xyl*2基因的重组酿酒酵母能将50%左右的木糖转化为乙醇和木糖醇。通过克隆树干毕赤酵母的*xyl*1和*xyl*2基因构建的酿酒酵母重组菌发酵混合糖，在24h乙醇浓度达22g·L^{-1}，乙醇得率为理论得率的90%左右。同时将改造的阿拉伯糖还原酶基因、来自里氏木霉*Trichoderma reesei*的*L*-阿拉伯糖醇脱氢酶基因、来自酵母*Ambrosiozyma monospora*的*L*-木酮糖还原酶基因和来自树干毕赤酵母的木糖醇脱氢酶基因一起转入酿酒酵母中，使重组菌可以同时利用木糖和*L*-阿拉伯糖。

另一方面，将淀粉、纤维素等多糖的水解与单糖的厌氧发酵同时结合在酿酒酵母细胞中的过程得到了广泛的研究。这个过程被称为同步协同糖化发酵工艺（SSF），它可以使酵母菌直接利用淀粉、纤维素等多糖类原料，省去预处理的过程以节约成本。纤维素的降解需要葡聚糖内切酶（EG）、纤维二糖水解酶（CHB）和β-葡聚糖苷酶（BG）3种酶以适当的活性共同作用才能实现。

酵母的表面展示技术是近几年发展起来的一项技术，它将目的蛋白和酵母的细胞壁蛋白融合表达后，将目的蛋白固定在酵母的表面。比较常用的细胞壁蛋白有α-凝集素和絮凝蛋白Flolp。表面展示不仅可以有效提高酶活力的稳定性，而且可以将表达、纯化和固定合于一体，节省时间和资源。用重组酵母菌共展示葡糖淀粉酶（来自米根霉，*Rhizopusoryzae*）和α-淀粉酶（来自脂肪嗜热芽孢杆菌，*Bacillus stearothermophilus*），以淀粉为原料分批发酵100h后乙醇浓度达60g·L^{-1}。利用共展示3种纤维素酶的重组酵母菌将无定形纤维素同步协同糖化发酵转化为乙醇。40h内利用10g·L^{-1}的无定形纤维素生产出大约3g·L^{-1}的乙醇。

9.5 抗逆性重组微生物的构建与应用

9.5.1 重组酶和重组细胞的抗逆性

抗逆性是指微生物对其生存不利的各种环境因素的抵抗能力的总称。在采用微生物细胞工厂来生产各种产品的过程中，不同的目的产品和不同的工业生物技术路线通常会面临共同

的问题，即：有机化学品产物或有害的环境往往会对微生物细胞或胞内酶产生严重的毒害效应，从而导致细胞死亡或酶催化剂失活，继而严重影响生物催化转化过程的生产效能。因此，开发对不同化学品产物或有害环境具有高耐受性的重组菌株，或者在进行生物催化的过程中具有高酶活力稳定性的催化细胞至关重要。针对这些问题，可以分别以酶或细胞为对象，通过酶工程与细胞工程等方法构建抗逆性重组酶或微生物，使其具备所需的性能。

9.5.2　重组酶的抗逆性改造研究

重组酶的抗逆性改造可以采用不同的基因工程策略。比如，对于耐高温木聚糖酶的改造，可以克隆嗜热木聚糖酶基因进行重组表达、可以进行酶的理性设计及定点突变引入二硫键以及通过融合表达策略稳定酶的空间结构等。

首先，将含有耐高温活性的木聚糖酶基因克隆并转到新的宿主细胞中表达是提高酶高温耐受性的常用方法。例如将含有来自于嗜热网球菌（*Dictyoglomus thermophilum*）Rt46B. 1 编码极端耐热木聚糖酶基因 *xynB* 的表达载体 pET – DBc 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3），目的基因在重组大肠杆菌中可表达出有活性且耐 90℃ 高温的木聚糖酶。

研究人员于 2004 年成功地在里氏木霉（*T. reesei*）的内切-1，4-β-木聚糖酶的 N 末端区域通过用 Cys 取代第 2 位和 28 位的 Thr，构建了一个二硫桥。该突变显著增加了这种嗜温木聚糖酶的热灭活半衰期，在 65℃ 时，其半衰期从约 40s 增加到 20min；70℃ 时从少于 10s 延长到约 6min。N 末端的二硫桥使得突变酶的热稳定性提高了大约 15℃。

XynB 是一种来自极端嗜热海栖热孢菌（*Thermotoga maritima*）、属于家族 10 的单结构域耐热木聚糖酶。CBM2b 是来自热紫链霉菌（*Streptomyces thermoviolaceus* STX – Ⅱ）的 2b 家族糖类结合单元。将 CBM2b 融合在 XynB 的羧基末端生成嵌合木聚糖酶。这种嵌合木聚糖酶（XynB – CBM2b）在 90℃ 以上仍然稳定，且催化可溶性木聚糖的活性比 XynB 也有提高。

如上所述，在了解酶的空间结构与功能的前提下，配合生物信息学技术，可以通过定点突变对酶进行抗逆性设计与改造，引入能够稳定蛋白质空间结构的力如离子键（盐桥）、共价键（二硫键）等，达到增强抗逆性的目的。*Humcola lanuginose* 脂肪酶存在着一个二硫键（C_{22}—C_{268}），通过定点突变引入另一个二硫键后，酶的稳定温度提高了 10℃。将 *Bacillus subtilis* 的 3 – 磷酸甘油醛脱氢酶第 281 位的 Gly 突变为 Arg，亚基间形成的离子键使酶的稳定性大大提高，半衰期增加了 10 倍。

然而定点突变只能够改变酶蛋白中有限的氨基酸残基，并且要求酶蛋白的空间结构和催化机制非常明晰，这对酶的改造存在着局限性。定向进化方法弥补了这些不足。定向进化是通过人为地创造特殊的条件，模拟自然进化机制（随机突变、重组和自然选择），在体外改造酶基因，并定向选择出具有改进功能甚至全新功能的蛋白质，使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现。它不需要事先了解酶的空间结构和催化机制。如改造来自 *Bacillus subtilis* 的酯酶，通过连续的易错 PCR 及 DNA 混编（DNA shuffling），成功得到一株含重组酶的重组菌。该重组菌对二甲基甲酰胺（DMF）的耐受性提高显著，在 15% 的二甲基甲酰胺溶液中水解对硝基苯甲酯的活力提高了 150 倍。研究报导采用定向进化重组的方法（易错 PCR、饱和诱变、交错延伸法等）同时优化了嗜冷枯草杆菌蛋白酶 S41 的热稳定性及催化活性。重组酶在 61℃ 时半衰期比野生型高了 500 倍，催化效率在很大温度范围内（10 ~ 60℃）也有大幅度的提高。

9.5.3 重组细胞的抗逆性改造研究

除了直接改造酶来提高酶的耐受性，还可以对酶的载体细胞进行改造，提高细胞对恶劣环境的耐受性，比如，耐热、耐渗透压、耐药性以及耐酸（碱）和耐有机溶剂等。对细胞的抗逆性进行改造，可以采用基因工程和代谢工程手段，通过强化某些目的基因的表达或阻断某些抑制基因的表达来实现，当然也可以通过常用的诱变育种、原生质体融合及菌株驯化方法来实现。如上节所述，利用原生质体融合技术产生的耐热酵母细胞可以在35℃和糖蜜浓度22%（质量分数）的条件下生长。

然而，细胞的抗逆性表型是受许多基因影响的。传统的基因与代谢工程研究方法的对象通常是单个目的基因或多个目的基因的敲除与高表达策略，以及对特定转录因子或DNA结合位点的重组修饰。这些方法往往局限于不能获得同步的、全局的最优结果。2006年，研究人员提出了一种微生物抗逆性改造的新方法——全局转录机器工程（global transcriptional machinery engineering，GTME）。以基因转录机器——RNA聚合酶（RNA polymerase，RNAP）为对象，在基因和细胞水平上采用全局转录调控方法对微生物细胞进行目的性能的全局强化。

RNA聚合酶能够执行多功能：首先识别DNA双链上的启动子；然后使DNA在启动子处解链成单链；通过阅读启动子序列，RNA聚合酶确定它自己的转录方向和模板链；接着以核糖核苷三磷酸（rNTP）为底物，以DNA的模板链为模板，在无需引物的情况下起始链的合成并按5′→3′方向互补延伸；最后当它达到终止子时，可以通过识别终止子序列来停止转录。形象地说，RNAP就像是细胞体内的一台多功能、高性能的“转录机器”（transcription machinery/vehicle），将遗传物质DNA与生物功能表现者蛋白质联系起来。

细菌RNA聚合酶由5种不同的亚基构成。首先包含一个由α、β、β′和ω亚基组成的α2ββ′ω核心酶，另外还有一个单独的σ亚基，与RNA聚合酶核心酶结合后形成RNAP全酶（holoenzyme）。其中，α亚基的功能主要是进行RNAP的连接与装配，同时可能参与全酶与启动子上游序列和激活子的识别与牢固结合；而σ亚基则能够特异性地识别与结合基因启动子的－35和－10区，从而激活基因的转录过程（图9-16）。σ亚基也被称为σ因子（sigma factor），这一族调控蛋白的基本功能就是增加RNAP对特定启动子的特异性结合，并将封闭的启动子复合物转换成开放的状态；一旦转录起始，σ因子即从全酶中脱离。目前大肠杆菌中发现的σ因子有7种，分别为：σ^D（σ^{70}）、σ^N（σ^{54}）、σ^S（σ^{38}）、σ^H（σ^{32}）、σ^F（σ^{28}）、σ^E（σ^{24}）和σ^{fecI}。其中，σ^D是最主要的σ因子（primary/housekeeping σ factor），负责与细胞生长相关的1000多个基因的转录控制；σ^S则负责细胞稳定期与压力响应相关的100多个基因的转录调控；σ^H调控细胞的热应激响应与压力响应基因（约40个）；σ^E则控制约5个极端热应激响应及外细胞质基因。

微生物RNA聚合酶对成百上千个基因的全局转录调控功能，决定了RNA聚合酶的基因突变能够同时引起众多基因表达强度的同步变化，从而使全局最优目的表型的高效筛选成为可能。

通过构建σ因子：σ^{70}基因*rpoD*的全局转录突变文库，研究人员成功地在大肠杆菌中筛选得到乙醇耐受性提高到70g·L^{-1}的重组突变株。接着，研究人员又证实了全局转录机器工程在酿酒酵母中的可行性，并成功筛选到一株葡萄糖/乙醇耐受性显著提高的重组菌，既能够耐受生物乙醇生产初始时的高浓度葡萄糖，也能够耐受后期的高浓度乙醇。采用类似的

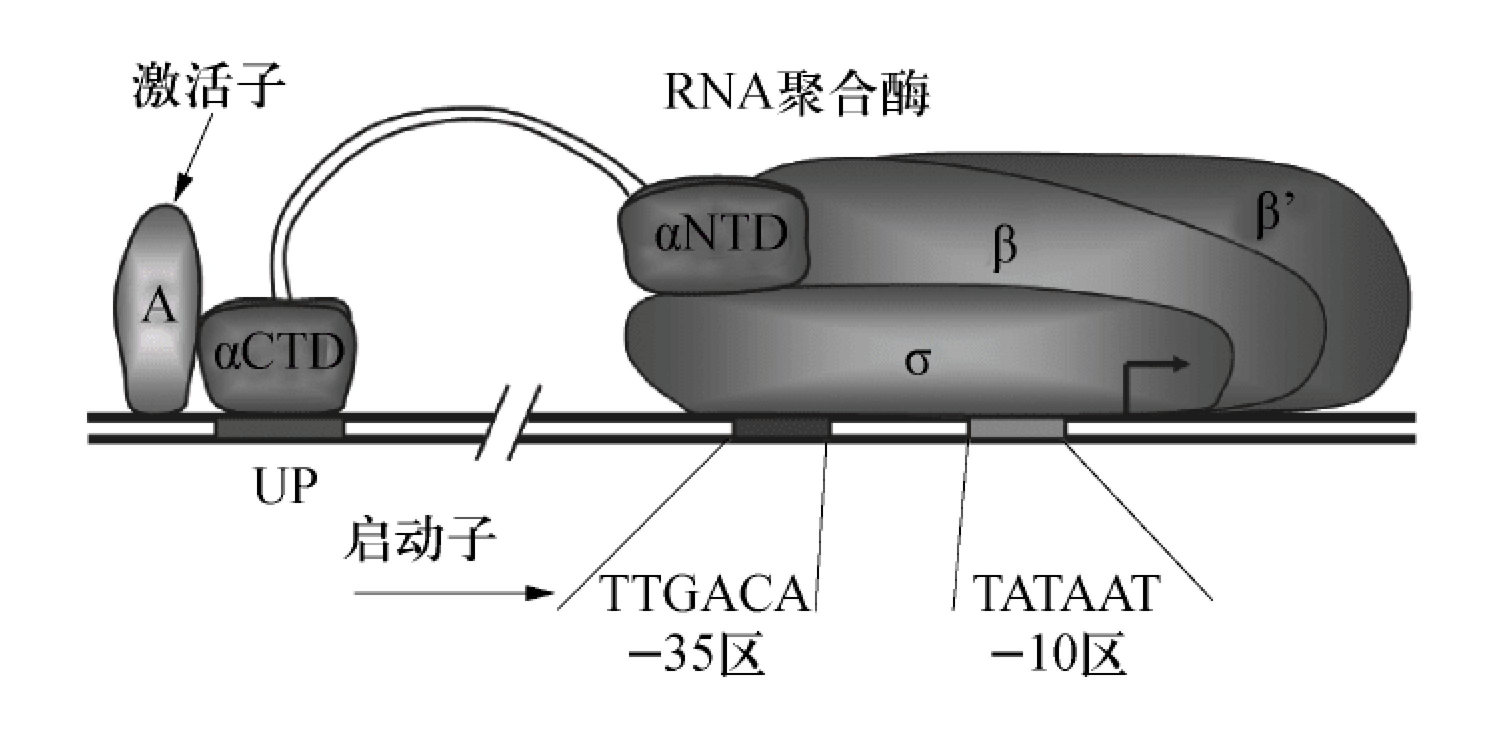


图 9-16　RNA 聚合酶 σ 因子与 α 亚基的功能示意图

σ 因子特异性地识别基因启动子的 –35 区和 –10 区，并激活转录过程的开始；α 亚基则在 C – 末端域（CTD）牢固结合某些启动子的上游区域（UP）或激活子，在 N – 末端域（NTD）结合 RNA 聚合酶

思路，还获得了木糖利用率从 0 提高到 98.2% 的突变株。全局转录机器工程同样适用于高产腈水合酶的红球菌。研究人员利用该方法成功筛选到一株丙烯酰胺耐受性显著提高的重组菌，在 40% 丙烯酰胺溶液浸泡下，重组菌腈水合酶的酶活力半衰期可以提高到出发菌株的 2.6 倍。

还有研究人员则针对 RNA 聚合酶的 α 亚基进行随机突变，在转录水平上产生对细胞表型调控的全局扰动，继而筛选获得各种性能提升的细胞表型。结果表明，RNA 聚合酶 α 亚基的突变不仅可以提高重组菌株对丁醇的耐受性，还可以显著促进透明质酸和 *L*-酪氨酸的重组合成。

与 RNAP 的调控功能相反，基因的启动子是 RNAP 的识别和调控对象。当保持 RNAP 的序列不变，而对启动子序列进行突变修饰时，同样可以改变 RNAP 和启动子的识别与结合特异性，从而改变该启动子调控的目的基因的表达强度，乃至启动子诱导表达的方式。最新的启动子工程研究表明，构建启动子突变库筛选不同的启动子表型来精密调控基因的表达也是非常有效的新方法。研究发现，对 λPL 启动子的突变可以大大强化 GFP 荧光蛋白、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶和磷酸脱氧木酮糖合成酶的表达水平，同样的研究结论也在酿酒酵母系统内得到。通过随机设计启动子 –35 和 –10 保守区之间的间距，成功构建了 *L. lactis* 的人工启动子突变库，可以应用于微生物抗逆性的研究中。

人工转录因子突变库的构建与应用也取得了明显的进展。以转录后的修饰控制元件为对象，如 mRNA 二级结构、RNA 酶（RNase）的剪切位点等建立了突变库来优化调控人工操纵子内不同基因的表达，也取得了良好的效果。针对与激活/抑制转录因子关联的锌指蛋白模体进行突变，在酿酒酵母中也筛选获得了对耐热、耐渗透压以及耐药性显著提高的突变表型。

在将来的研究中，除具有生长调控功能的 σ 因子 σ^{70}、σ^{S} 外，还可以对调控几十种热应激响应基因的 σ 因子 σ^{H} 和 σ^{E} 等进行抗逆性改造研究。对 RNAP 其他亚基进行随机突变研究的可行性也值得探索。而对应转录过程的起始、延伸和终止，乃至转录后修饰控制的各个关键环节，进行随机突变以产生全局扰动并进行全局转录调控研究，也将引起越来越多的兴趣。

9.6　重组微生物培养过程中的关键问题

基因重组菌的发酵目的是通过外源基因的高表达获得目的蛋白，或者通过胞内代谢途径的变化合成新的代谢产物，阻断代谢副产物或强化目的代谢产物的生产等。基因重组微生物和野生菌株一样，都要经过发酵培养过程才能实现各种目的蛋白或者目的产物的高效生产。因此，重组微生物的生产性能，一方面通过基因工程手段来提升；另一方面则依赖于合理的发酵工艺。根据重组微生物的遗传性能和发酵放大的特点，进行良好的发酵罐设计、合理的

发酵过程控制以及操作工艺优化，都可以充分发挥重组菌的生产能力，保证大规模产业化过程的顺利进行。

重组微生物在培养过程中应重视如下关键问题：

1. 种子的质量 种子是微生物发酵生产的起步。种子的质量直接影响菌株的生产能力。基因重组微生物通常在质粒载体或基因组上携带抗生素抗性基因，因此可以通过添加相应抗生素的甘油管或抗性平板加以稳定保藏。另外，由于对接种量的限制和降低染菌概率的考虑，工业规模的发酵过程通常不能将实验室制备的种子直接接种到发酵罐中，而是需要逐级放大的过程。对于含质粒的重组微生物，为了保证种子的质量，可以在种子培养基中加入适量的抗生素，以保证质粒的遗传稳定性，并避免杂菌的污染。但在较大的种子罐乃至吨级以上发酵罐中，通常不加入抗生素，以避免环境中抗生素的扩散问题以及降低生产成本。当然，影响野生菌种子质量的其他因素，比如种子的传代次数、种子培养基的配方和培养条件、接种种龄和接种量等，同样也影响重组微生物的种子质量。

2. 菌株的稳定性 重组微生物发酵的稳定性一方面取决于种子的质量，另一方面也取决于菌株本身的稳定性。对于含质粒重组菌，菌株的稳定性主要指质粒载体的遗传稳定性；对于不含质粒的重组菌，则指染色体上基因的回复突变或转座突变等的概率。其中，在正常培养条件下，不含质粒重组微生物的染色体突变概率相对较低，本章所述的重组菌的稳定性，主要是指含质粒重组微生物的质粒稳定性。

3. 合理的发酵工艺 它是重组微生物培养的另一个关键环节。这里所说的发酵工艺包括的范围比较广泛，大至整个发酵过程控制及其与分离过程的耦合设计，分批培养、补料分批培养乃至连续培养等培养方式的确定，小至发酵罐和搅拌桨的设计与操作、培养基配方的优化、培养温度、pH、溶氧等培养条件的确定等，都和重组微生物的生产能力密切相关。

一般情况下，重组微生物的最终产率取决于 2 个要素：细胞培养密度和单细胞的生产能力。因此，一个好的发酵工艺，首先要尽可能实现重组细胞的高密度培养；其次是实现目的基因的高表达，使每个细胞的产能达到最优——最终实现目的产物的高效生产。

细胞的高密度培养技术是现代发酵工程的重要内容。外源基因的高水平表达或目的代谢产物的大量合成，同时与重组细胞的遗传性能和环境条件密切相关。对于一株遗传性能优越的基因工程菌株，通过合理的发酵工艺创造合适的细胞生长和产物合成的环境条件，就可以获得高产的目的产物。

对于不携带外源质粒的重组细胞，一般采用与野生菌株类似的方法，对发酵条件进行实验设计，并根据重组细胞的遗传性能对发酵工艺进行优化调整，最终获得优选的发酵培养新工艺。

与野生菌不同的是，对于携带质粒的重组微生物，还需要考虑质粒上外源基因的高表达，尤其是对于含有诱导型质粒的重组微生物，需要额外考虑外源基因的诱导表达方式及诱导条件等。比如，对于采用 pET 系列质粒表达目的蛋白或工业酶的重组大肠杆菌，需要在发酵培养过程中确定什么时候、多少量、采用何种诱导剂或诱导方式（IPTG、乳糖或升温）来启动质粒载体上外源基因的高表达；诱导后是否需要切换培养温度或 pH，以强化外源蛋白的可溶性、活性表达等。

重组微生物的高密度培养工艺近年来受到许多研究人员的重视，并产生很多学科交叉的前沿问题。比如，为了实现重组微生物的高密度发酵培养，细胞群体效应信号分子和信号传导问题正成为国内外的研究热点。而为了解决反应器和搅拌桨设计以及发酵过程放大效应等，计算机流体力学模拟方法的研究和应用也越来越深入和广泛。另外，基因重组微生物在

细胞培养和产物合成过程中，细胞的生理代谢状态和胞内的物质和能量分配会发生很大的改变，这种变化反过来又会影响到重组蛋白的合成和目的产物的积累，从而也会影响到下游的产物分离纯化和回收过程。比如，重组细胞中外源蛋白的过量表达会降低重组菌的最大摄氧能力，从而使得乙酸副产物更容易积累，不利于重组细胞的生长和目的蛋白的表达；重组蛋白或重组产物的过量积累还会影响到细胞的通透性、肽链翻译的准确率、细胞的形态和分裂能力等。为此，宿主细胞为了适应大量额外的代谢信号，经常会产生一系列的应激反应以维持细胞的正常功能和生存。

重组微生物的细胞生长动力学参见第 5 章。

9.7　重组微生物的综合评价

如引言中所述，在能源、资源短缺制约国家经济持续发展、影响国家安全的形势下，工业生物加工过程是降低对化石资源依赖、增加目标产物新品种和提高产品性能的有效途径；对于维护可持续发展的和谐生态环境具有重要意义。为此，工业生物过程的核心——生物酶催化剂或微生物细胞工厂的重组改造与高效制备，已经引起了世界各国政府、科研单位以及企业界的全面和高度重视。

随着蛋白质工程、细胞工程和代谢工程以及基因组学、蛋白质组学和系统生物学等生物相关学科的高速发展，以及分子生物学技术手段的飞速进步，对微生物进行重组改造的方法和策略也越来越丰富、越来越先进；微生物性能的改善和提升程度也随之越来越显著。总体而言，相对于野生菌株，基因重组微生物不仅具有更优异的性能，而且其性能的改造还可以随着生物技术的发展而不断提升。

在最新的质粒稳定性研究中，开发了一种全新的化学诱导染色体进化（chemically induced chromosomal evolution）新方法，可以在没有质粒载体的情况下，实现目标基因在染色体上的多拷贝高表达，从而不存在质粒不稳定问题。在最近的细胞代谢工程改造研究中，报道了运用多元自动基因组工程（multiplex automated genome engineering）加速进化重组细胞的新方法。通过 λ-Red 辅助重组，在单链寡核苷酸中大规模引入目标代谢途径中的各个基因的插入和敲除突变，建立多元复合基因突变库；进而通过对同一细胞的循环转化，实现多个目标位点的同时定位、突变；而且通过自动化装置的设计和构建，实现了细胞代谢途径的连续、自动控制改造。对于多目标蛋白的协同表达，最新报道的合成代谢管道新方法创造性地解决了多蛋白表达量不匹配的问题，通过支架在空间上顺序排布代谢途径中的多个蛋白，且通过不同的比例进行排布，实现了代谢流量的模块控制和重要产物的高效产出。

总之，在工业生产实践中，基因重组微生物既可以通过外源质粒载体的构建和引入高表达蛋白酶，制备生物酶制剂或酶催化剂；还可以通过胞内代谢途径改造以及基因复制、转录或翻译等环节的调控策略进行胞内合成、胞外分泌或整细胞催化生产目标产物。在不久的将来，基因重组微生物在工业生物技术中的应用过程中必将全面取代野生菌株，在生物法生产化学品、医药产品中间体以及生物材料、生物能源等领域发挥至关重要的作用。

本章小结

本章在论述工业生物技术重要性的基础上，对重组微生物的构建方法和反应动力学基础——尤其是质粒稳定性问题及解决质粒不稳定性问题的策略进行了阐述；对利用重组微生

物生产蛋白酶的基本策略以及异源蛋白在酵母菌中的重组表达进行了介绍；对利用重组微生物生产细胞代谢产物的方法和进展，包括可生物降解材料、透明质酸、胰岛素、生物乙醇等实例，进行了详细的说明；进一步从重组酶和重组细胞两个不同的角度，简要介绍了微生物抗逆性的研究进展及全局转录机器工程新方法。最后，本章对重组微生物培养过程中的关键问题进行了阐述，介绍了重组微生物的高密度发酵培养策略，强调了重组微生物的重要应用前景。

参考文献

B R 格利克，J J 帕斯捷尔纳克 . 2005. 分子生物技术——重组 DNA 的原理与应用 . 陈丽珊，任大明主译 . 北京：化学工业出版社

陈三凤，刘德虎 . 2003. 现代微生物遗传学 . 北京：化学工业出版社

孔庆学 . 2006. 酿酒酵母遗传操作降低甘油合成提高乙醇产量的研究：[学位论文] . 天津：天津大学化工学院

李寅，高海军，陈坚 . 2006. 高细胞密度发酵技术 . 北京：化学工业出版社

娄凯，于安峰，邢新会 . 2004. 重组大肠杆菌生产极端耐热木聚糖酶 . 过程工程学报，4（5）：445 ~ 450

马建岗 . 2007. 基因工程学原理 . 第 2 版 . 西安：西安交通大学出版社

山根恒夫 . 2006. 生物反应工程 . 第 3 版 . 邢新会译 . 北京：化学工业出版社

于慧敏 . 产 PHB 多功能重组大肠杆菌的构建及高密度表达研究：[学位论文] . 北京：清华大学图书馆，2001

于慧敏，王勇 . 2009. 全局转录机器工程——工业生物技术新方法 . 生物产业技术，4：42 ~ 46

张友尚 . 2008. 胰岛素生产的回顾与展望，食品与药品，10（1）：1 ~ 3

Alper H，Stephanopoulos G. 2007. Global transcription machinery engineering：a new approach for improving cellular phenotype. Metabolic Engineering，9：258 ~ 267

Dueber J E，Wu G C，Malmirchegini G R，et al. 2009. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nature Biotechnology，27（8）：753 ~ 759

Lehninger A L，Nelson DL，Cox MM. 1992. Principles of Biochemistry. 2nd. New York：Worth Publishers，Inc

Sanchez O ，Cardona C. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology，99：5270 ~ 5295

Tyo K E J，Ajikumar P K，Stephanopoulos Gregory. 2009. Stabilized gene duplication enables long-term selection—free heterologous pathway expression. Nature Biotechnology，27（8）：760 ~ 765

Wang H H，Isaacs F J，Carr P A，et al. 2009. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature，460：894 ~ 898

Widner B，Behr R，Von Dollen S. 2005. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*，Appl Environ Microbiol，71（7）：3747 ~ 3752

习　题

1. 基因重组微生物通常可以分为哪两类？各有什么特点和适用范围？

2. 基因工程菌的遗传不稳定性的两种主要表现形式是什么？影响质粒载体稳定性的主要因素有哪些？

3. 解决基因工程菌的质粒分离不稳定性的对策有哪些？你认为哪种方式更有效？

4. 实验室中，你的研究课题是要高效制备可溶的头孢菌素 C 酰化酶。你应该从哪些方面入手去制订实验方案？

5. 现有活菌数为每毫升 2.0×10^6 个的大肠杆菌感受态细胞悬浮液，用于外源重组质粒的转化。在 100μl 感受态细胞溶液中加入 2μl 质粒溶液（质粒浓度：$100\mu g \cdot ml^{-1}$）进行转化。转化后的菌悬液取 50μl 涂布在不含有抗生素的固体培养基平板上和含有抗生素的同样尺寸的固体平板上。前者得到 160 个单菌落，后者得到 89 个单菌落。根据上述信息，分别计算：

（1）以活菌为基准的质粒转化效率（%）；

（2）以 DNA 为基准的质粒转化效率（细胞/μg 质粒）？

6. 利用重组微生物，以胞内合成方式或胞外分泌方式生产目的代谢产物，你认为关键的要素各有哪些？

7. 利用重组微生物的整细胞作为催化剂，以游离细胞或固定化细胞的方式生产目的产物时，你认为关键的要素有哪些？

8. 重组微生物的发酵培养过程需要注意哪些问题？

9. 诱导型启动子和组成型启动子各有什么优、缺点？分别适用于什么样的重组体系？

第 10 章　动、植物细胞反应工程

【重要概念】

细胞工程、细胞凋亡、细胞周期、细胞系、固定化培养、悬浮培养、贴壁培养、动物细胞生长动力学、植物细胞培养体系、剪切应力

引言

动、植物细胞反应过程、酶促反应过程和微生物细胞反应过程共同组成了生物反应过程，这是依据生物反应过程中生物催化剂的不同而区分的。动、植物细胞反应过程作为生物反应过程的重要组成部分，是全面了解和掌握生物反应工程必不可少的内容。同时，动、植物细胞“催化剂”具有优于其他生物催化剂的特点和优势，其在基础研究及应用方面均发挥着重要的作用。动、植物细胞反应工程研究主要包括动、植物细胞工程和动、植物细胞反应过程控制及动、植物细胞反应工程的应用等。由于动、植物细胞工程涉及的研究对象及相关技术差异较大，本章将分别从动物细胞工程和植物细胞工程两大部分进行介绍。动、植物细胞培养技术发展史见表 10-1。

表 10-1　动、植物细胞培养技术发展史对照表

植物细胞培养技术发展	动物细胞培养技术发展
1756 年，Moncean 首先发现植物在受伤愈合的组织皮层内能产生芽。	1907 年，美国的 Harrison 在世界上首次将蛙的神经组织在试管内培养，创立体外组织培养法。
1902 年，G. Haberlandt 提出高等植物的组织、器官可以不断分割，直到单个细胞，并进行了植物叶肉细胞、腺毛细胞、髓细胞、气孔保卫细胞、表皮细胞的培养试验。	1911 年，Carrel 发现了鸡胚浸出液对于某些细胞的生长具有很强的促进效应，还把无菌技术引到了组织培养技术中，在不含抗菌素的培养条件下使鸡胚心脏细胞维持生存了 34 年，先后继代 3400 次，证明动物细胞有可能在体外无限地生长。
1904 年，Hanning 对萝卜和辣根菜未成熟胚进行培养，离体胚可以充分发育并提早形成小苗。	1951 年，Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的培养基。
20 世纪 30 年代，White 和 Gautheret 等首次建立了植物细胞和器官培养技术。	1957 年，Graff 用灌注培养法创造了悬浮细胞培养史上绝无仅有的每升（1 ~ 2）$\times 10^{10}$ 个细胞的记录，标志着现代灌注概念的诞生。
1958 年，Steward 等和 Reinert 等以胡萝卜为材料，首次通过实验证实了 Haberlandt 的关于细胞全能性的设想。	1962 年，Capstile 成功地大规模悬浮培养小鼠肾细胞（BHK），标志着动物细胞大规模培养技术的起步。
1964—1966 年，Guha 和 Maheshwari 在毛曼陀罗花粉培养中诱导未成熟花粉形成单倍体。	1967 年，Van Wezel 用 DEAE – Sephadex A50 为载体培养动物细胞获得成功。

续表

植物细胞培养技术发展	动物细胞培养技术发展
1967 年，Kaul 和 Staba 采用多升发酵罐对小阿米（*Ammi visnaga*）进行了细胞大量培养的研究，首次利用该方法得到了药用成分呋喃色酮。	1975 年，Sato 等在培养基中用激素代替血清使垂体细胞株 GH3 在无血清介质中生长获得成功，预示着无血清培养技术的诱人前景。
1971 年，Takebe 等从烟草叶肉细胞分离得到原生质体，并培养成完整的植株。	1975 年，Kobhler 和 Milstein 成功地融合了小鼠 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞而产生能分泌预定单克隆抗体的杂交瘤细胞。
1972 年，Carlson 对 2 个种的烟草原生质体进行了融合培养，并成功获得第一个体细胞杂交的杂种植株。	1986 年，DemoBiotech 公司首次用微囊化技术大规模培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体获得成功。
1983 年，日本三井石油公司首次利用培养的紫草细胞生产出紫草宁。	1989 年，Konstantinovti 首次提出大规模细胞培养过程中的生理状态控制，更新了传统细胞培养工艺中优化控制理论。
1990 年，代谢工程开始出现，结合基因工程技术，对植物细胞引入关键基因，影响细胞的代谢，如通过转基因技术使颠茄植物的天仙子胺到东莨菪碱的转化增强。	1997 年，Wilmut 等首例报道了世界第一只克隆羊多莉的诞生。证明了哺乳动物高度分化的细胞同样含有全套遗传信息，亦能在一定条件下发育成动物个体，进一步证明了动物细胞的全能性。

10.1　动、植物细胞工程概论

动、植物细胞工程作为生物工程学科领域中迅速发展起来并具有生物技术与化学工程理工结合特色的新型工程学，在基础研究和应用研究方面都越来越受到生物技术界的重视，现已成为生物工程学科主要前沿领域之一。利用人工培养的动、植物细胞，可以分离和鉴定病毒，进行遗传工程、代谢及其调节方面的研究，并能根据其表达产物方面的优点（如转录后修饰等），生产出许多与人类健康和生存密切相关的生物技术产品。因此，动、植物细胞培养工程正在逐步形成一个独特的高新技术产业，并显示出巨大的工业发展前景。

细胞工程是现代生物工程的重要组成部分，它出现于 20 世纪 70 年代末至 80 年代初，是在细胞或细胞器水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术。通常，细胞工程根据其研究细胞类型的不同分为动物细胞工程和植物细胞工程。

10.1.1　动、植物细胞概述

1665 年，英国物理学家胡克（Robert Hooke）应用自制显微镜观察到了“细胞”的雏形，人类便揭开了认识细胞的序幕。随着显微观察技术的发展及对细胞结构功能认识的逐步深入，德国人施莱登（Matthias Jacob Schleiden）和施旺（Theodar Schwann）在 1838—1839 年提出了细胞学说，“学说”指出一切动、植物体都是由细胞发育而来，并由细胞和细胞产物所构成，每个细胞作为一个相对独立的单位，既有它“自己的”生命，又对与其他细胞共同组成的整体的生命有所助益，新的细胞可以通过老的细胞繁殖产生；细胞不仅是生物体的构成单位，而且是功能单位。“细胞学说”的提出大大促进了细胞相关研究和应用学科的发展，细胞工程学和细胞工程技术均是在对细胞有足够认识的基础上发展起来的。

细胞种类繁多，个体差异也较大。一般依据细胞是否具有核被膜分为原核细胞（prokaryotic cell）和真核细胞（eukaryotic cell）。无论是真核细胞还是原核细胞，其基本结构包括细胞膜、细胞质和细胞核或核区，具体依据细胞的类型不同，其结构组成有所差异。动、植物体作为高等生物，其基本组成单位细胞属于真核细胞。动、植物细胞体积较大，内有细胞核和众多膜系构造细胞器，分别行使特异的功能。虽然同样都是真核细胞，动、植物细胞结构组成上也有较大的差异：植物一般以光合自养的营养方式存活，多数植物体细胞中含有叶绿体，将光能转化为化学能，将无机物转化为有机物，而动物细胞内没有叶绿体的结构；除了叶绿体之外，植物细胞胞内一般有液泡，胞外还有数层以纤维素为主要成分的细胞壁包围在细胞膜外，这些都是动物细胞所没有的结构。

动、植物细胞在结构组成上与微生物等原核生物也有着极大的差别，这就决定了其培养性能及代谢活动与微生物也存在着显著的差异。动、植物细胞相对微生物细胞个体较大，一般大于 10μm。真核细胞由于有核膜结构，将细胞核与细胞质分隔开来，其基因转录与翻译并不在同一场所完成，且表达产物有翻译后的加工过程。动、植物细胞生长繁殖速率慢，细胞耐受剪切应力能力弱，营养要求高，环境适应性差等（表 10-2）。

表 10-2　微生物和动、植物细胞的培养特征

比较项目	微生物	动物细胞	植物细胞
大小	1 ~ 10μm	10 ~ 100μm	10 ~ 100μm
悬浮生长	可以	多数细胞需附着表面才能生长	可以，但易结团，无单个细胞
营养要求	简单	非常复杂	较复杂
生长速率	快，倍增时间 0.5 ~ 5h	慢，倍增时间 15 ~ 100h	慢，倍增时间 24 ~ 74h
代谢调节	内部	内部、激素	内部、激素
环境敏感	不敏感	非常敏感	能忍受广泛范围
产物存在	胞内或胞外	胞内	胞内或胞外
细胞分化	无	有	有
剪切应力敏感	低	非常高	高
传统变异，筛选技术	广泛使用	不常使用	有时使用
细胞或产物浓度	较高	低	低
产物种类	疫苗、激素、抗体、生长因子、免疫调节剂等	酶、生物碱、天然色素、有机化合物等	发酵食品、抗生素、有机化合物、酶等

动、植物细胞一般都有明显的细胞周期。不同的细胞，细胞周期不同。培养细胞的周期短，细胞增殖大于细胞耗损，属生长旺盛型的细胞群。但细胞在培养过程中，细胞周期活动并非恒定，常随培养阶段不同而有所变化，如在接种或传代后，细胞并不立即进入活跃的周期活动，一般先要经过一个潜伏期。潜伏期是细胞适应或同化培养基的过程。不同培养细胞的潜伏期长短不一样：传代细胞系的潜伏期短，初代培养细胞的潜伏期长；另外潜伏期长短也与接种细胞的数量有关，一般接种细胞多比细胞少时潜伏期短。一个细胞周期就是细胞一次倍增的时间，而各种细胞倍增的时间也不同。培养中“代”的概念指一次接种到再培养的时间，并不等于细胞周期。实际细胞传代一次，细胞能倍增多次。不同类型的细胞其培养周期中的倍增次数也有所差异。然而，无论是何种动、植物细胞，都具有处于有丝分裂时期染色体呈现高度螺旋紧缩状态的特点，这样，既不利于基因外调，也不利于外源基因的插入，为动、植物的遗传稳定性提供了可靠的保证。

10.1.2　动、植物细胞工程的地位及主要技术组成

细胞工程与基因工程、酶工程、发酵工程共同组成了现代生物技术的主要技术内容，近年来又加入了蛋白质工程等新内容。与其他技术不同，细胞工程是在细胞水平上的工程技术，是连接分子水平各种生物大分子和个体水平各种器官、系统的综合生命活动，细胞工程是现代生物技术间的桥梁和纽带（图 10-1）。

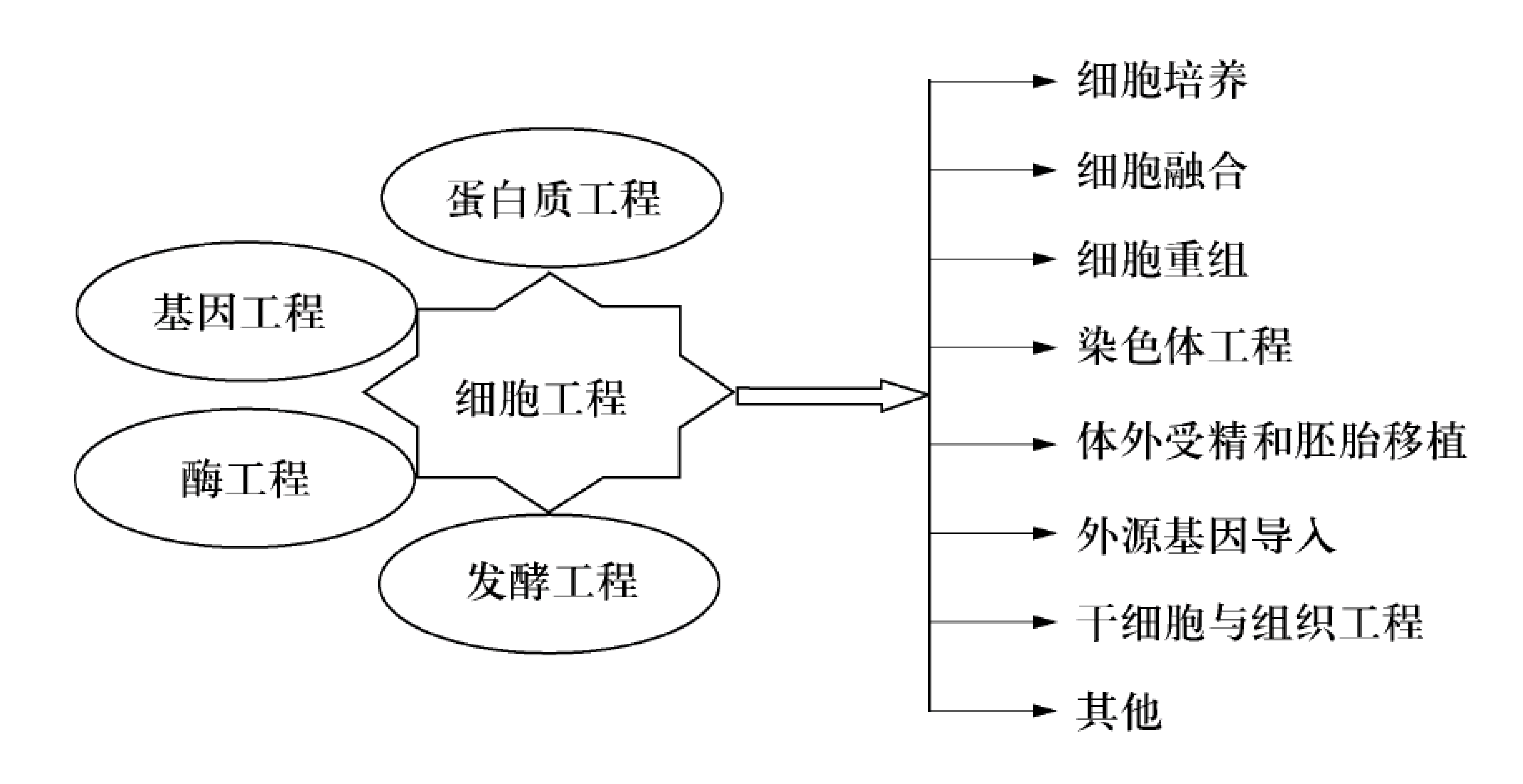


图 10-1　细胞工程地位及主要技术

迄今为止，人们在细胞操作技术方面从基因水平、细胞器水平以及细胞水平等多层次广泛开展了大量的研究工作，在细胞培养、细胞融合、细胞代谢产物的生产和克隆等方面取得了辉煌的成就，其应用上的价值越来越受到人们的重视。

随着现代生物工程技术的发展，细胞工程涉及的基本技术也在不断地进步。动物细胞工程包括动物细胞培养、动物细胞融合和单克隆抗体、细胞拆合和胚胎移植、干细胞工程等，植物细胞工程主要研究植物组织培养、植物原生质体融合和植物细胞遗传转化等(图 10-1)。其中动、植物细胞培养技术是一项将动、植物的组织、器官或细胞在适当的培养基上进行无菌培养的技术，它是动、植物细胞工程的重要技术之一，是其他细胞工程技术的基础。

10.1.3　动、植物细胞工程的应用

随着基因工程技术的发展，人们逐渐认识到有许多基因产物不能在原核细胞内表达，它们需要经过真核细胞所特有的翻译后修饰，以及正确的切割、折叠后，才能形成与自然分子一样的功能和抗原性，使得动、植物细胞一跃成为一种重要的宿主细胞，用以生成多种生物制品或细胞次生代谢产物，例如病毒疫苗、淋巴因子（干扰素和白细胞介素等）、单克隆抗体、肿瘤坏死因子及紫杉醇、人参皂苷等植物有效成分。这些采用动、植物细胞大规模培养技术生产贵重药品及保健品在临床诊断、治疗和预防等方面都有重要意义。

细胞工程作为科学研究的一种手段，它已经渗入到现代生活的各个方面，成为现代生物技术必不可少的配套技术。在农林、园艺、医学等领域中，细胞工程正在为人类作出巨大的贡献。

第一，在农业生产中，利用细胞工程技术进行作物育种和繁殖，是迄今人类受益最多的一个方面。采用花药单倍体育种途径，培育出了近百个具有优良性状的水稻品种（或品系）和 30 多个小麦品系，较常规的杂交育种，大大缩短了育种周期。而快繁脱毒技术已解决了马铃薯的退化问题，实现了香蕉去病毒试管苗的产业化和商品化，大大提高了香蕉的产量。

通过植物体细胞的遗传变异，筛选各种有经济意义的突变体。

第二，在临床医学与药物方面，利用动物细胞融合技术和细胞大规模培养技术已生产和正在生产大量的专一性强、自然界中含量少的医药产品。自 1975 年利用动物细胞融合技术首次获得单克隆抗体以来，许多人类无能为力的病毒性疾病得以解决。用单克隆抗体可以检测出多种病毒中非常细微的株间差异，鉴定细菌的种型和亚种。这些都是传统血清法或动物免疫法所做不到的，而且诊断异常准确，误诊率大大降低。例如，抗乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的单克隆抗体，其灵敏度比当前最佳的抗血清还要高 100 倍，能检测出抗血清的 60% 的假阴性。同时，单克隆抗体已成功地应用于临床治疗，主要是针对一些还没有特效药的病毒性疾病，尤其适用于抵抗力差的儿童。人们正在研究“生物导弹”——单克隆抗体作为载体携带药物，使药物准确地到达癌细胞，以避免化疗或放疗把正常细胞与癌细胞一同杀死的不良反应。通过培养、诱变等操作或细胞融合途径生产各种疫苗、菌苗、抗生素、生物活性物质、抗体等，大大提高了效率。1982 年美国科学家用诱变和细胞杂交手段，获得了可以持续分泌干扰素的体外培养细胞系，现已得到应用。紫杉醇（taxol）是红豆杉属植物的次生代谢产物，主要存在于红豆杉植物的树皮中，它以其独特的抗癌机制和显著的疗效成为目前最重要的抗癌药物之一。然而有限的红豆杉资源难以满足日益增长的临床需求，利用红豆杉细胞培养生产紫杉醇是解决紫杉醇药源危机的一条行之有效的途径。多家研究单位近年来一直在对红豆杉细胞培养生产紫杉醇进行研究，初现成效。除红豆杉外，现已实现工业化培养植物细胞生产次生代谢产物的植物有紫草、人参、青蒿等。

第三，繁育优良品种。目前，人工授精、胚胎移植等技术已广泛应用于畜牧业生产。精液和胚胎的液氮超低温（-196℃）保存技术的综合使用，使优良公畜、禽的交配数与交配范围大为扩展，并且突破了动物交配的季节限制。另外，可以从优良母畜或公畜中分离出卵细胞或精子，在体外受精，然后再将人工控制的新型受精卵种植到种质较差的母畜子宫内，繁殖优良新个体。综合利用各项技术，如胚胎分割技术、核移植细胞融合技术、显微操作技术等，在细胞水平改造卵细胞，有可能创造出高产奶牛、瘦肉型猪等新品种。特别是干细胞技术的建立，更展现了美好的前景。

10.2 动物细胞反应原理

动物细胞的生长、繁殖以及产物的合成都需要经过一系列反应，一方面提供细胞物质合成和产物合成的中间代谢产物，另一方面提供给细胞进行这些反应的能量。这样，细胞将营养成分吸收，通过一系列反应，使之变成有用的产物或细胞物质。然而，细胞的生长、繁殖和代谢等反应性质与细胞的类型、环境因素、细胞状况等有着密切的关系。本节将从细胞分类及细胞系、细胞的损伤和死亡、动物细胞生长动力学、动物细胞培养工艺和哺乳动物外源蛋白质表达宿主细胞改造等几个方面进行介绍。

10.2.1 细胞分类和细胞系

1. 依据细胞培养特性的分类 大多数体外培养的动物细胞生长具有贴壁依赖性和细胞接触抑制等特点。贴壁依赖性指体外培养的动物细胞必须附着在固体表面才能够生长的特性。接触抑制现象指当细胞布满贴附固体表面后即停止生长。当然，也有一些动物细胞能够在悬浮状态下生长，如淋巴细胞；还有一些细胞，既可贴壁生长，也可悬浮生长。这样，体

外培养细胞依据它们在培养器皿内是否能够贴附于支持物上的生长特性，可分为贴壁依赖性细胞和非贴壁依赖性细胞两大类。非贴壁依赖性细胞在培养中类似于微生物和植物细胞的深层培养。对于贴壁依赖性细胞，当细胞布满贴附表面停止生长后，若取走一片细胞，存留的细胞就会重新布满创面。从生长表面脱落进入液体的细胞通常不再生长而逐渐退化，这种细胞的培养称为单层贴壁培养。贴壁培养的细胞可用胰蛋白酶、酸、碱等试剂或机械方法处理，使之从生长表面上脱落下来。

黏附于固体表面是贴壁依赖性细胞生命活动的基本要求，细胞贴壁生长过程基本包括黏附和铺展两个过程。黏附是决定细胞是否能够成功培养的第一步，接种的细胞在培养液中停留的时间越长，越容易发生退化。不同的细胞其黏附能力不同，一些分化程度高、生长能力差的细胞黏附能力较弱，如神经元、羊水细胞。细胞黏附速度也与提供的生长表面有关，对于一些黏附能力弱的细胞可以通过在贴附表面提供有利于细胞黏附和生长的生物活性物质来促进细胞的黏附。除了生长表面对黏附的影响之外，一些物理、化学和生物的因素也会影响细胞的黏附，如离心、低温、培养液中的黏附因子等，在细胞培养过程需严格控制好这些因素。铺展是细胞生命活动的一种基本特征。铺展得越开，细胞越扁平，与生长基质接触面就越大。只有当细胞铺展到合适的程度，DNA 的复制才开始进行，细胞的生长及繁殖才有可能发生。细胞的铺展过程先由圆形变成圆饼形，逐渐铺开伸展成为扁平的极性细胞。

由于没有细胞壁，细胞非贴壁形态是圆形的，贴壁后，细胞逐渐变成其特有的形状。依据细胞贴壁后形态的不同，将贴壁依赖性细胞分为成纤维细胞、上皮细胞、游走细胞和多形性细胞。

（1）成纤维细胞（fibroblast 或 mechanocyte type）：这种细胞形态与体内成纤维细胞形态相似故而得名。细胞体呈梭形或不规则三角形，中央有圆形核，胞质向外伸出 2 ~ 3 个长短

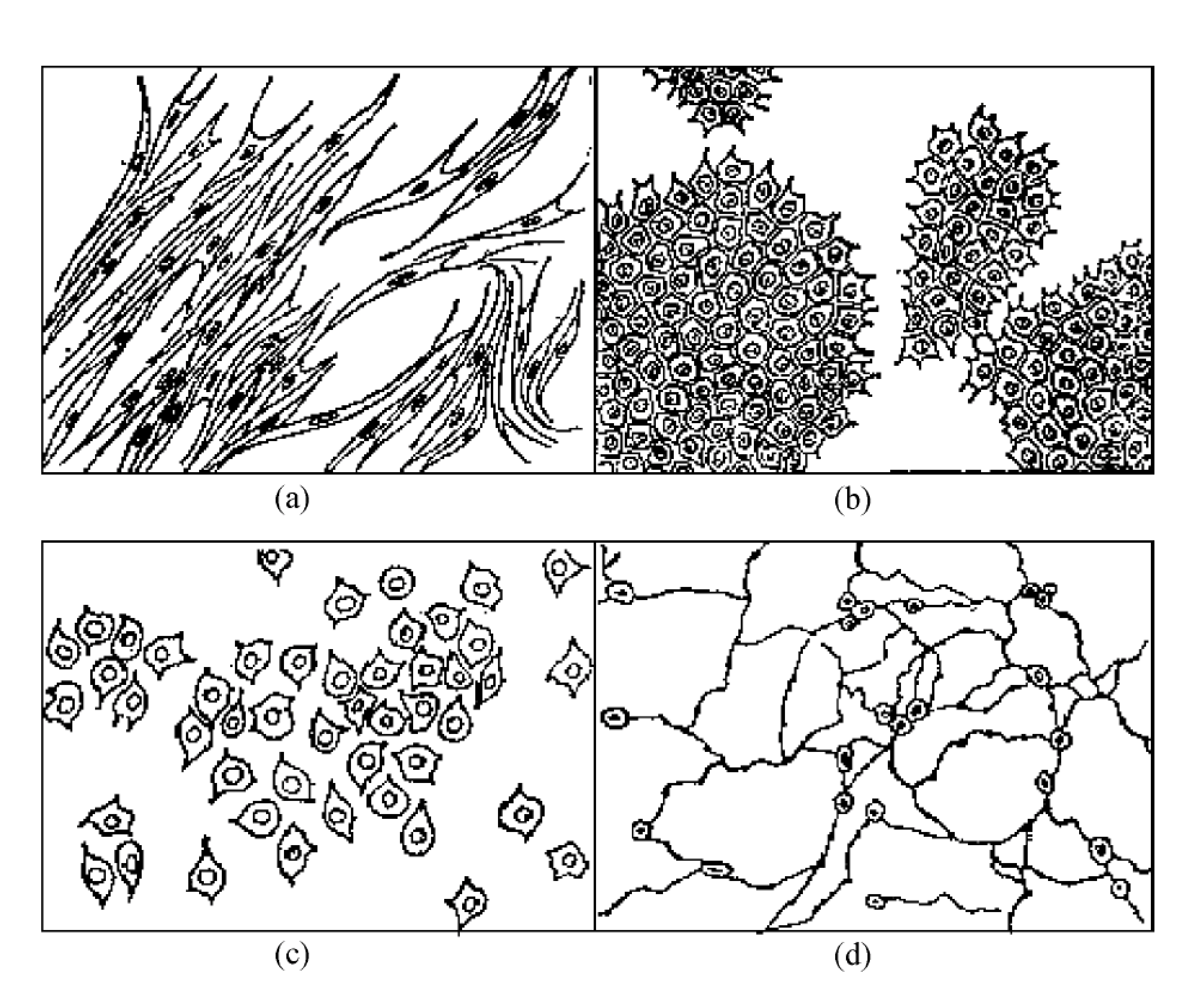


图 10-2　动物细胞形态

（a）成纤维细胞；（b）上皮细胞；（c）游走细胞型；（d）多形性细胞型

不同的突起。细胞群常借原生质突起连接成网，生长时呈放射状、旋涡或火焰状行走，如图 10-2（a)所示。除真正的纤维细胞外，凡由中胚层间质来源的其他组织细胞，如血管内皮、心肌、平滑肌、成骨细胞等，也多呈成纤维细胞形态。实际上很多所谓成纤维细胞并无产生纤维的能力，只是一种习惯上概括的称法。

（2）上皮细胞（epithilium cell type)：这种细胞呈扁平的不规则三角形，中央有圆形核，生长时常彼此紧密连接单层细胞片，如图 10-2(b）所示，起源于外胚层和内胚层组织的细胞，如皮肤表皮及衍生物（汗腺、皮脂腺等），肠管上皮细胞以及肝、胰和肺泡上皮细胞，培养时皆呈上皮型。

（3）游走细胞（wondering cell type)：这种细胞的培养需要在支持物上生长，一般不连接成片，细胞胞质经常出现伪足或突起，呈活跃的游走和变形运动，速度快而且方向不规则，如图 10-2(c）所示。此型细胞不很稳定，有时亦难和其他型细胞相区别，在一定条件下，如培养基化学性质变动等，它们也可能变为成纤维细胞。

（4）多形性细胞（polymorphic cell type)：除上述 3 种细胞外，还有一些组织和细胞，如神经组织的细胞等，难以确定它们的稳定形态，可统归多形性细胞，如图 10-2(d）所示。

上述这 4 种细胞形态均属于贴壁依赖型细胞，培养这类细胞时，常需贴附在支持物上生长，但由于培养环境的变化，细胞形态也常发生改变。

2. 依据细胞培养物的分类 细胞培养指从体内组织取出细胞模拟体内生存环境，在无菌、适当温度及酸碱度和一定营养条件下，使其生长繁殖并维持结构和功能的一种培养技术。从体内取出细胞首次培养即为原代培养（primary culture)，这是细胞培养的最初和必经阶段。当原代培养细胞生长到一定时期，受到群体环境限制，就需要转移到另一容器才能继续生长，称为传代或继代培养（subculture)。根据原代培养物性状的一致性与否，传代成功后称为细胞系（cell line）或细胞株（cell strain)。这些细胞一般可顺利传代 40 ~ 50 次，并保持染色体二倍体数量和接触抑制，传至 50 代左右时则出现生长停滞，大部分衰老死亡，此类称为有限细胞系（株)，是正常的细胞。

具有接触抑制的正常细胞在培养过程中可能获得无限增殖的能力，成为无限细胞系(株)。这样的细胞中的染色体常变为异倍体，贴壁依赖性细胞对贴壁的依赖性及细胞密度的抑制发生了改变，成为转化细胞。转化细胞由于有无限的生长能力，培养中更容易生长，被广泛用于生物制品的生产。

除以上所提到的细胞外，与人类的健康生活密切相关的还有一类细胞——肿瘤细胞。它是来自于肿瘤组织或经肿瘤细胞与其他细胞融合产生的细胞，如杂交瘤细胞。与转化细胞相比，肿瘤细胞是恶性的，常表现为非贴壁依赖性，有很好的增殖能力，生长速率高，对生长因子的依赖程度低，对培养环境的要求不十分苛刻等特点。肿瘤细胞所具有的特性使得其在单抗技术及重组蛋白生产中被广泛使用。

3. 常用细胞系 表 10-3 列出了一些常用于科学研究及细胞工程生产生物产品的细胞系，并对它们的细胞类型、来源及培养液与血清进行了简单介绍。除了这些细胞系外，还有许多已经培养成功的细胞系，如美国菌种保藏中心（ATCC)，又称美国模式菌种收集中心，是现今世界上最大的细胞库，现已商品化了的细胞系就有 3000 多个，对它们的来源、生长特性、培养条件及培养基等都有较详细的资料。

表 10-3　常用细胞系列表

细胞系名称	细胞类型	物种	来源组织	培养液与血清
293	成纤维细胞	人	胚胎肾	MEM，10% 马血清
3T6	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM，10% FBS
A549	上皮样	人	肺癌	F-12K，10% FBS
A9	成纤维细胞	小鼠	结缔组织	DMEM，10% FBS
AtT-20	上皮样	小鼠	垂体肿瘤	F-10，15% 马血清 +2.5% FBS
BALB/3T3	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM，10% FBS
BHK-21	成纤维细胞	仓鼠	肾	DMEM，10% FBS 或 MEM，10% FBS 和 NEAA
BHL-100	上皮样	人	乳腺	McCoy5A，10% FBS
BT	成纤维细胞	牛	鼻甲细胞	MEM，10% FBS 和 NEAA
Caco-2	上皮样	人	结肠腺瘤	MEM，20% FBS 和 NEAA
Chang	上皮样	人	肝	BME，10% 牛血清
CHO-K1	上皮样	仓鼠	卵巢	F-12，10% FBS
Clone 9	上皮样	大鼠	肝	F-12K，10% FBS
Clone M-3	上皮样	小鼠	黑色素瘤	F-10，15% 马血清 +2.5% FBS
COS-1	成纤维细胞	猴	肾	DMEM，10% FBS
COS-3	成纤维细胞	猴	肾	DMEM，10% FBS
COS-7	成纤维细胞	猴	肾	DMEM，10% FBS
CRFK	上皮样	猫	肾	MEM，10% FBS 和 NEAA
CV-1	成纤维细胞	猴	肾	MEM，10% FBS
D-17	上皮样	犬	骨肉瘤	MEM，10% FBS 和 NEAA
Daudi	淋巴样	人	淋巴瘤患者外周血	RPMI-1640，10% FBS
GH1	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10，15% 马血清 +2.5% FBS
GH3	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10，15% 马血清 +2.5% FBS
H9	淋巴样	人	T 细胞淋巴瘤	RPMI-1640，20% FBS
HaK	上皮样	人	肾	BME，10% 牛血清
HCT-15	上皮样	人	结肠腺癌	RPMI-1640，10% FBS
HeLa	上皮样	人	宫颈癌	MEM，10% FBS 和 NEAA（在溶液中，S-MEM）
HEp-2	上皮样	人	喉癌	MEM，10% FBS
HL-60	淋巴样	人	早幼粒细胞白血病	RPMI-1640，20% FBS
HT-1080	上皮样	人	纤维肉瘤	MEM，10% HI FBS 和 NEAA
HT-29	上皮样	人	结肠腺癌	McCoy's 5A，10% FBS
HUVEC	上皮样	人	脐带	F-12K，10% FBS 肝素 100 ug · ml^{-1}

续表

细胞系名称	细胞类型	物种	来源组织	培养液与血清
I-10	上皮样	小鼠	睾丸肿瘤	F-10，15% 马血清 +2.5% FBS
IM-9	淋巴样	人	骨髓瘤患者骨髓	RPMI-1640，10% FBS
JEG-2	上皮样	人	绒毛膜癌	MEM，10% FBS
Jensen	成纤维细胞	大鼠	肉瘤	McCoy's 5A，5% FBS
Jurkat	淋巴样	人	淋巴瘤	RPMI-1640，10% FBS
K-562	淋巴样	人	髓系白血病	RPMI-1640，10% FBS
KB	上皮样	人	口腔癌	MEM，10% FBS 和 NEAA
KG-1	髓样细胞	人	红白血病患者骨髓	IMDM，20% FBS
L2	上皮样	大鼠	肺	F-12K，10% FBS
L6		大鼠	骨骼肌成肌细胞	DMEM，10% FBS
LLC-WRC 256	上皮样	大鼠	癌	培养基 199，5% 马血清
McCoy	成纤维细胞	小鼠	未知	MEM，10% FBS
MCF7	上皮样	人	乳腺癌	MEM，10% FBS NEAA，10μg·ml⁻¹胰岛素
WEHI-3b	巨噬细胞样	小鼠	粒单细胞白血病	DMEM，10% FBS
WI-38	上皮样	人	胚胎肺	BME，10% FBS
WISH	上皮样	人	羊膜	BME，10% FBS
WS1		人	胚胎皮肤	MEM，10% FBS 和 NEAA
XC	上皮样	大鼠	肉瘤	MEM，10% FBS 和 NEAA
Y-1	上皮样	小鼠	肾上腺肿瘤	F－10，15% 马血清 +2.5% FBS

10.2.2 细胞的坏死与凋亡

由于动物细胞的特殊结构特点，动物细胞对其环境的变化极其敏感，培养条件的些许变化都将引起细胞不可逆的损伤，甚至细胞死亡。细胞的死亡主要通过细胞凋亡（apoptosis）和细胞坏死（necrosis）两种途径实现。

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD），指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序性的死亡，它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用，是具有生理性和选择性的。程序性死亡的细胞不引起炎症反应，不遗留瘢痕，死亡的细胞碎片很快被巨噬细胞或邻近细胞清除，不影响其他细胞的正常功能。而细胞坏死是因病理而产生的被动死亡，如物理性或化学性的细胞损伤因子及缺氧与营养不良等均导致细胞坏死。坏死细胞的膜通透性增高，致使细胞肿胀，细胞器变形或肿大，早期核无明显形态学变化，最后细胞破裂。另外坏死的细胞裂解要释放出内含物，并常引起炎症反应；在愈合过程中常伴随组织器官的纤维化，形成瘢痕（图 10-3）。

引起细胞损伤和细胞坏死的因素很多，主要是极端的环境条件的变化造成的，如培养液中营养成分的缺乏、细胞代谢产物积累、细胞在反应器中所受到的作用力等的变化都会引起

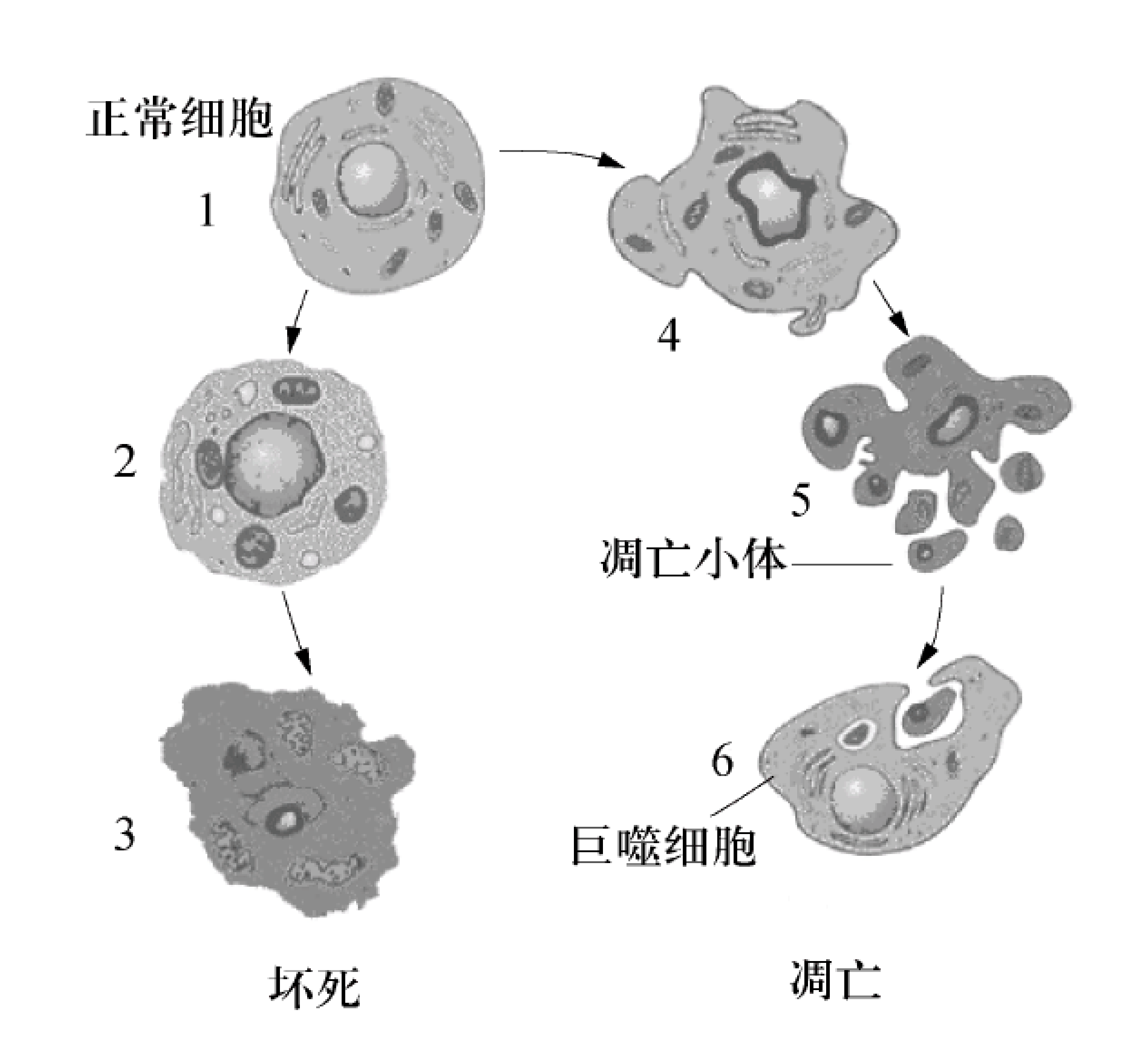


图 10-3　细胞凋亡与细胞坏死过程中细胞形态区别

左为细胞坏死：1. 正常细胞；2. 细胞和细胞器肿胀、核染色质边集；3. 细胞膜、细胞器膜和核膜破裂、崩解、自溶。右为细胞凋亡：4. 细胞和细胞器皱缩，胞质致密，核染色质边集；5. 胞质分叶状凸起并形成多个凋亡小体，并与胞体分离；6. 邻近巨噬细胞等包裹、吞噬凋亡小体

细胞的损伤，致使细胞死亡。细胞凋亡是细胞自身参与的生物过程，各种环境信号导致细胞凋亡信号的启动，引起迅速的细胞“自杀”行为。

然而，细胞坏死与细胞凋亡并不是完全无关的。体外培养的动物细胞在培养过程中所处的环境不断变化，当环境压力作用的时间及强度较高的时候，细胞来不及逐级开启自身的死亡程序，而是以快速的细胞坏死来应对剧烈变化的环境。然而，动物细胞培养过程中的环境变化多数情况下是比较温和的，细胞或者产生对环境压力的耐受或不能耐受这样的压力而按预定的程序死亡。

依据细胞凋亡出现的一些形态与生理等方面的特征的不同，通常可将检测方法分为形态测定法、组织学和细胞化学方法、放射自显影、扫描电镜、散射电子成像、放射免疫、X 射线显微镜、流式细胞术、原位荧光检测技术等。这些技术可以对细胞凋亡进行定性或定量的检测，有些技术甚至能够做到实时监测。

在实际的工业化生产过程中，体外培养的动物细胞死亡多数为细胞凋亡，造成细胞凋亡的主要原因就是培养环境条件的变化。为了减小细胞凋亡产生的频率，提高生产效率，可以通过稳定培养液的营养成分，外源添加一些抑制细胞凋亡的物质及利用基因工程的方法使细胞在培养中大量表达凋亡抑制基因等来抑制细胞的凋亡。

10.2.3　动物细胞生长动力学

动物细胞接种入新鲜培养基后，在合适的培养条件下经历了一个完整的培养周期：迟滞期、指数生长期、稳定期（静止期）和衰亡期。细胞首先经过一个在培养液中的悬浮期，待其贴附于载体表面后，悬浮期结束。经过一个迟滞期，细胞进入指数生长期，这个时期的细胞代谢旺盛，生长快，细胞分裂指数高。当细胞生长至一定数量时，由于细胞生长空间的限制，出现了接触抑制现象，这时只要培养条件合适，细胞仍能够增殖分裂。当细胞密度进一步增大时，培养液中的营养成分减少，代谢产物增多，细胞停止增殖，进入稳定期。稳定期后的细胞，由于其所处环境条件进一步恶化或是细胞本身的遗传特点决定了细胞进入衰亡期，这时的细胞大量死亡。

在整个生长周期中，动物细胞的生长和产物的形成是多种环境因子和细胞内复杂的代谢反应的综合结果，反应机制以及各种环境条件与这些反应的关系目前还不十分清楚，很难用简单的方程式来进行表达。因此，动物细胞反应动力学的研究，在很大程度上是借鉴微生物反应动力学的理论。研究细胞生长动力学主要研究细胞的生长速率，通常用细胞的质量或者是数量随时间的变化情况来表征。细胞生长（数量或质量的增加）可规定如下：

（1）精确的细胞生长率（μ）[即每单位生物量（质量/数量）的生长率]

$$\mu = (1/c_X)(dc_X/dt)h^{-1} \tag{10-1}$$

式中：dc_X 表示增加的细胞质量；dt 表示间隔时间；c_X 表示细胞质量。

如果生长速率衡定（如对数生长期）则：

$$\ln c_X = \ln c_{X_0} + \mu \cdot t \tag{10-2}$$

式中：c_{X_0} 表示在 t_0 时间的生物量。

（2）二倍增长时间（t_d）[即细胞群体在数量/质量增长 1 倍时间]

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \tag{10-3}$$

（3）倍增度（n）或倍增次数（即接种物复制的次数）

$$n = 3.32\lg(x/x_0) \tag{10-4}$$

以上只是对细胞的生长速率做一个简单的定义。事实上，对动物细胞的生长动力学的研究远不止这些。前面的内容已经提到，体外培养细胞生长状况在很大程度上受到各种环境因素的影响。为了使动物细胞生长处于最佳状况，了解环境因素对其影响无疑是很重要的。影响动物细胞生长、繁殖的环境因素很多，主要有温度、pH、营养成分、溶氧及气体环境、渗透压及其他因素等。同时，不同的培养工艺对细胞的生长状况也有着较大的影响。因此，在研究动物细胞生长动力学时需要考虑多方面的因素，具体的情况需要具体的对待。有关动物细胞培养环境将在 10. 2. 4 节中介绍。

10. 2. 4 动物细胞培养工艺

利用动物细胞培养技术生产生物制品，培养工艺过程包括 3 个阶段：第一阶段是准备阶段，包括设备的准备、清洗、消毒，培养基的配制和灭菌，细胞种子的复苏、检测和扩增等。动物细胞培养过程要求较高，准备工作是非常关键的一步。第二阶段是细胞培养阶段，包括细胞接种、培养工艺参数的调整，取样分析，培养基更换等。第三阶段是产物生产阶段，包括病毒准备和接种或产物表达诱导剂的加入，培养物的收获及分析。在有些系统当中，细胞培养与产物生产阶段是不可分的，如单克隆抗体的生产和某些中组蛋白的表达过程。

目前，动物细胞培养工艺较多，归纳起来一般分为 3 大类：贴壁培养、悬浮培养和固定化培养。通常依据目的、要求以及细胞培养特性的不同选择适宜的培养工艺。

1. 贴壁培养　它指细胞贴附在一定的固体表面进行的单层培养。由于细胞紧密的黏附于固相表面，可直接倾去旧培养液，清洗后直接加入新培养液，无需复杂的细胞截留系统，便于采用灌注培养，以达到提高细胞密度的目的，且贴壁后很多细胞更有利于有效地表达产品。但与悬浮培养工艺相比，贴壁培养扩大较困难，投资大，占地面积大，不能有效地监测细胞的生长。

通常，依据吸附固相的不同贴壁培养系统主要有滚瓶、中空纤维、玻璃珠、微载体系统

等，其中以滚瓶培养和微载体生物反应器培养更为多见。滚瓶为细胞提供了贴附的表面，在滚动过程中实现了气体的交换，适合于实验室规模的动物细胞培养（图 10-4）。微载体培养中微载体具有更大的比表面积，为细胞提供了充足的贴附比表面积，是公认的最有发展前途的一种动物细胞大规模培养技术。细胞紧密地贴附于微载体上，在反应器的搅拌下，同微载体一起悬浮于培养液中，兼具悬浮培养和贴壁培养的优点，易于放大。微载体一般为直径 60～250μm 的微珠，表面较光滑，与细胞具有相容性，无毒，密度大于培养基，耐高温，基质材料非刚性等。常用的商品化微载体有 3 种，即 Cytodex、Cytopore 和 Cytoline。利用生物反应器系统进行微载体大规模细胞培养，适合微载体培养的生物反应器系统和培养模式有搅拌式生物反应器系统、旋转式生物反应器系统以及灌注式生物反应器培养模式等。



图 10-4　滚瓶培养系统

除了微载体培养系统外，还有巨载体培养模式。巨载体是相对于微载体和细胞而言的，是固定于生物反应器中，不因为搅拌而跟随培养液一起运动。这样，比较容易更换培养液，不需要特殊的分离细胞和培养液的设备，但其放大培养较困难，多用于制备用量较小、价值高的生物制品。

2. 悬浮培养　细胞悬浮培养指细胞在反应器中自由悬浮生长的过程，主要用于非贴壁依赖性细胞培养，与微生物发酵过程比较接近，但由于动物细胞对搅拌和通气造成的流体剪切应力很敏感，在反应器的结构和操作上又有特殊的要求，需要进行专门设计。保护细胞免受剪切的严重伤害是放大培养的一个十分重要的问题。通过加入特殊的保护剂（如血清和一些高分子化合物），能使细胞在温和的搅拌和通气条件下正常生长。杂交瘤细胞的悬浮培养是研究最广泛和透彻的动物细胞培养过程，培养规模大，操作成熟。

3. 固定化培养　它是将动物细胞与水不溶性载体结合起来，再进行培养的方法，适用于贴壁和非贴壁依赖性细胞，具有细胞生长密度高，抗剪切应力和抗污染能力强等优点，细胞易于与产物分开，有利于产物分离纯化。细胞固定化的制备方法很多，包括吸附法 、共价贴附法、离子/共价交联法、包埋法、微囊法、自絮凝法等。

（1）吸附法：用固体吸附剂将细胞吸附在其表面而使细胞固定化的方法称为吸附法。该法操作简单，条件温和，是动物细胞固定化中最早研究使用的方法。缺点是载体的负荷能力低，细胞易脱落。

（2）共价贴附法：利用共价键将细胞与固相载体结合的固定化方法称为共价贴附法。此法可减少细胞的泄漏，但须引入化学试剂，对细胞活性有影响，且因贴附而导致扩散限制小，细胞得不到保护。

（3）离子/共价交联法：用双功能试剂处理细胞悬浮液，会在细胞间形成桥而絮结产生交联作用，这种固定化细胞方法称为离子/共价交联法。交联剂会使一部分细胞死亡，也会产生扩散限制。

（4）包埋法：将细胞包埋在多孔载体内部制成固定化细胞的方法称为包埋法。这种方法的优点是步骤简便，条件温和，负荷量大，细胞泄漏少，抗机械剪切；缺点是存在扩散限制，并非所有的细胞都处于最佳营养浓度，且大分子营养物不能渗透到高聚物网络内部。一

般适用于非贴壁依赖性细胞的固定化，常用载体为多空凝胶，如琼脂糖凝胶、海藻酸钙凝胶和血纤维蛋白。

（5）微囊法：用一层亲水的半透膜将细胞包围在珠状的微囊内，细胞不能溢出，但小分子物质及营养物质可自由出入半透膜。囊内的微小培养环境，与液体培养相似，能保护细胞少受损伤，故细胞生长好，密度高，富集细胞及其产物，简化了下游加工技术。微囊直径控制在 200～400μm 为宜。制备工艺应温和、快速、不损伤细胞，尽量在液体条件和生理条件下操作，所有试剂和膜材料对细胞无毒害，膜的孔径可控制以使营养物和代谢产物自由通过，膜应有足够的机械强度抵抗培养中的搅拌作用。目前以海藻酸钠－聚赖氨酸－海藻酸钠（APA）微囊技术发展最为成熟。研究发现，海藻酸的纯度与微囊的生物相容性直接相关。金属有机物，硅化微晶纤维素等新型的微囊化材料也在实验室规模取得了一定的成功。在对微囊的形态进行重新设计的过程中，采用微囊与中空纤维膜相结合的新型微囊化技术和反应器。中空纤维减小了气体传质对微囊的损伤，增加了整体的稳定性，取得了较好的效果。微囊固定化最大的问题是由于制备过程采用化学方法，使得其性质很不稳定，质量标准难以控制。同时，微囊化培养过程中的消毒、清洗复杂且易染菌。上述缺点最终导致整个系统的不稳定性增强，这是微囊化技术的应用受到限制的主要原因。

（6）自絮凝法：许多哺乳动物细胞系，特别是在无血清培养下，具有相互聚集、形成细胞团的倾向。利用细胞的这一特性，可采用沉降或过滤的手段，使细胞团截留在搅拌培养系统中，起到类似于微载体和多孔载体的作用，结合细胞培养过程中的检测和控制，实现细胞的高密度长期培养和产物的高效生产。由于细胞团中细胞密度近似于组织中的细胞密度，存在于细胞团内的物质扩散限制可能影响细胞活力。由搅拌产生的流体运动既是搅拌培养系统中影响物质扩散效率和细胞团粒直径分布的主要因素，也是可形成损伤细胞的流体剪切应力。合理控制培养基组成和培养条件，CHO、BHK、HEK293 细胞的自絮凝细胞团法培养都已经有成功的报道。

10.2.5 哺乳动物外源蛋白质表达宿主细胞改造

在原核或真核细胞等各大外源蛋白质表达系统中，哺乳动物细胞表达系统表达的糖基化蛋白最接近天然蛋白质分子，是目前重组糖蛋白质生产的首选体系。同时它也是较复杂的分子如抗体，以及基因治疗用病毒载体的唯一的表达宿主。然而工业化规模生产生物制品需要对哺乳动物细胞进行大规模培养。血清培养基由于受成本昂贵、批次间存在差异以及供应渠道不畅等多种因素的限制，加上血清的存在会给下游纯化工作带来困难，无血清培养基（SFM）或无蛋白培养基（PFM）逐渐开始成为规模化生产培养基的热点。由于没有血清提供生长刺激因子、黏附因子、扩展因子以及其他细胞生长存活的必需成分，用这两者培养哺乳动物细胞会面临巨大挑战，如细胞活力差、贴壁性差等，尤其是在其生产后期易于发生细胞凋亡。通过 DNA 重组技术，利用代谢工程手段，从哺乳动物细胞内部重新设计改造细胞，使细胞更强壮，适应能力更强，具备体外培养条件下的自身调节能力，适应产业化规模培养的要求。下面将介绍近年来对哺乳动物外源蛋白质表达宿主细胞优化改造的各种解决途径，包括无血清培养、细胞代谢通路、细胞贴壁、细胞凋亡与增殖以及产物糖基化等。

1. 适应无血清培养 无血清培养可降低生产成本，简化分离纯化步骤，已取代血清培养基用于重组蛋白的大规模表达，如适用于杂交瘤细胞生长的 CCM-1，适用于 CHO 细胞生长的 CHO-S-SFMⅡ、CCM5 和 proCHO-CDM。然而美中不足的是，无血清培养基所必需的两

种蛋白质成分，即胰岛素和转铁蛋白都是动物来源的，实际上这种无血清培养基并没有消除血清带来的安全隐患。因此，能否利用细胞自身分泌表达以上两种成分并促进自身生长将有效解决上述难题。如研究者试图利用 CHO 实现以上目的。Pak 等用 IGF-1 代替胰岛素转染成的共表达 IGF-1 和转铁蛋白基因的 CHO 细胞在蛋白培养基中生长良好，称为超级 CHO。但细胞的无限增殖并不总是有利的，IGF-1 的持续表达可导致细胞不可控的增殖，贴壁细胞随着养分的消耗和代谢废物的积累必然导致细胞凋亡。为了控制细胞的增殖，研究人员在超级 CHO 的基础上构建了可控的超级 CHO。他们将乳糖操纵子序列置于 IGF-1 基因上游，而乳糖操纵子的阻遏蛋白基因则另置于金属硫蛋白启动子之后。在细胞培养前期，IGF-1 可以不断分泌而促使细胞增殖，当目的产物达到最高峰时，便在培养基中加入金属离子，激活金属硫蛋白启动子表达阻遏蛋白，从而阻止 IGF-1 的表达，使细胞停止分裂增殖。而 IGF-1 的下游信号分子在引入细胞后亦可获得适宜无血清生长条件的细胞系。

2. 改变细胞的能量代谢途径　乳酸和氨是哺乳动物细胞生长过程中产生的两种主要代谢废物。它们的积累对细胞的生长有很大的负面影响，并最终影响目的蛋白质的产量。减少这两种代谢产物的积累，是大规模细胞培养工艺优化的一个重要努力方向。乳酸在哺乳动物细胞中是糖不完全氧化的产物。在氧气不足的情况下，糖酵解产生的 NADH 不能被及时氧化，从而阻碍了糖酵解的顺利进行，造成 ATP 产生不足。此时乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）被激活，将糖酵解产生的丙酮酸和 NADH 反应生成乳酸与 NAD，从而保证了糖酵解的顺利进行。但在培养的哺乳动物细胞中，即使氧十分充足，也会产生乳酸。乳酸对细胞培养的负面影响不仅仅在于使培养基 pH 降低。即使通过添加碱性物质使 pH 维持稳定，细胞生长和重组蛋白表达仍会受到影响。限制培养基中葡萄糖的含量是减少乳酸产生最常用的方法，但葡萄糖含量过低造成细胞营养不足，也会抑制细胞的生长。这种方法需要对糖的消耗速率、乳酸的产率以及目的蛋白的表达量等一系列参数进行综合考虑才能发挥作用。现在生物反应器的溶氧在线控制技术十分成熟，细胞几乎不会受到缺氧的威胁，那么乳酸脱氢酶似乎不是必需的。因此，利用现在已经十分成熟的基因打靶技术将乳酸脱氢酶基因从细胞中敲除似乎是一个很好的解决办法。通过在杂交瘤细胞中进行尝试，可能仅敲除了一个 *LDH-A* 等位基因，但仍使乳酸的产生大为减少，而细胞的培养周期则大为延长，单克隆抗体的产量也大为增加。

另一种代谢废物氨主要由谷氨酰胺和天冬酰胺产生。限制培养基中谷氨酰胺的含量也是防止氨过量产生的一个重要方法。谷氨酰胺为细胞生存所必需，但细胞自身可以通过谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase，GS）将氨和谷氨酸合成谷氨酰胺。硫胺甲硫氨酸（methionine sulphoxamine，MSX）是谷氨酰胺合成酶的抑制剂，在无谷氨酰胺的培养基中，MSX 可以作为扩增 *GS* 基因的选择药物，所以 MSX-GS 能够作为一种基因共扩增系统。应用这种扩增系统的宿主细胞必须利用氨合成谷氨酰胺，所以氨的产量极大减少。同时培养基中不必添加谷氨酰胺，给培养基的保存带来极大方便，因为谷氨酰胺容易分解。MSX-GS 系统应用于骨髓瘤细胞，氨的产量也明显减少，抗体产量也显著提高。

3. 改进细胞贴壁性　应用无血清培养基培养哺乳动物细胞时，由于没有血清提供各种贴壁因子，细胞以悬浮的方式生长。在实际的大规模细胞培养中，哺乳动物细胞往往以贴壁方式培养，要么贴壁于悬浮的微载体中，要么贴壁于固定的聚酯盘状介质或中空纤维中，而很少直接悬浮于培养基中。由于驯化细胞难以在短时间内适应培养基，故通过基因工程手段改造宿主细胞于无血清培养基中贴壁生长，并完成转染于高表达株筛选为一条新的思路。有

研究发现纯化的玻形粘连蛋白单一成分就可以介导 CHO 细胞在 SFM 中的贴壁和扩展。与其他黏附因子相比，玻形粘连蛋白结构简单，分子质量相对较小，仅 114kDa，容易克隆和操作其基因。在 *MMTV* 启动子控制下的人玻形粘连蛋白基因导入了 CHO 细胞，使其获得了贴壁生长和扩展的能力，并且在完全无血清的情况下，选择出了多株单克隆细胞株，为解决上述困难开辟了一条新路。

4. 增强细胞抗凋亡能力 哺乳动物工程细胞在大规模培养生产重组蛋白时很容易发生细胞凋亡，从而导致生产过程提前终止，造成生产成本高昂。溶氧过高或过低、营养或血清缺乏、有害代谢产物积累等各种轻微的不利条件即可引起细胞凋亡。仅依靠优化这些外部培养条件很难彻底解决细胞的凋亡问题。细胞凋亡由各种凋亡信号诱导，Bcl－2 蛋白是其中的一个重要调节组分。通过过表达 *Bcl*－2 基因，已使多种工程细胞系包括 CHO 细胞、杂交瘤细胞、骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞等获得了不同程度的抗凋亡能力。细胞代谢产物氨对于细胞凋亡也起到明显的促进作用。细胞谷氨酰胺合成酶可以利用氨和谷氨酸合成谷氨酰胺，因而可以通过过表达 *GS* 基因，并且在无谷氨酰胺组分的培养基中培养细胞，使细胞通过氨和谷氨酸合成谷氨酰胺供给自身营养需要，而达到降低培养基中氨的目的。应用 GS 加压系统在 CHO 细胞中高表达中国仓鼠 Bcl－2 蛋白，在内源调控细胞抗凋亡能力的同时，外源降低培养基中氨的含量，从而有效抑制了培养细胞的凋亡率。

5. 控制细胞增殖速率 细胞在大规模培养初期，目的蛋白的表达和细胞的增殖速率呈正相关，即细胞增殖越快，目的蛋白表达量越高。但当反应器中细胞的密度达到饱和后，细胞继续增殖会导致营养和氧的大量消耗以及乳酸、氨等有毒代谢产物的大量积累，细胞逐渐凋亡，重组蛋白表达量逐渐降低。此时若要维持细胞活力，就必须加大培养基灌流速度以加快营养的补给和废物的去除。此举虽可暂时延长生产时间，但增加了生产成本，重组蛋白被极大稀释也会给下游纯化带来困难。而且反应器中细胞密度不能无限增大，细胞活力的持续下降和目的蛋白产量持续降低最终会使生产提前终止。为解决以上问题，在生物反应器中细胞密度达到理想值时，控制细胞增殖速率就成为大规模细胞培养能否成功的关键。在早期杂交瘤细胞的培养研究中，细胞分裂抑制主要通过限制必需营养成分或在培养基中加入 DNA 合成抑制剂以及加入基因组毒性物质而实现的。但这种方法干扰细胞正常代谢，影响细胞活力，无法长时间培养。1993 年，研究人员利用一个温度敏感的 CHO 细胞系建立了温控型生长抑制表达系统。该系统在温度升至 39℃ 时可获得生长抑制，总外源蛋白产率有所提高。但是长时间暴露于较高温度下，细胞活力迅速降低，生产周期仍难以达到理想的程度。

已知细胞周期由 4 个时相即 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期组成。在细胞周期的进展中，存在几个关键的“检查点”（check point），它们决定细胞周期是否继续。若细胞无法通过检查点，要么停止生长，要么凋亡。就我们关心的生长抑制方面，在 G_1/S 检查点较易实现。该检查点由一系列基因精确地调控着。这种调控机制为从基因层面控制细胞的增殖提供了可能。

6. 改善重组蛋白质糖基化 蛋白质的翻译后的修饰（如糖基化、甲基化、磷酸化等）对其活性有很大的影响。糖链影响糖蛋白的药理活性、生理和生化活性（溶解度、稳定性、折叠和分泌）及药代动力学（半衰期、靶向性、免疫原性和抗原性）。糖基化的类型与多肽链本身、宿主细胞有关。一般情况下，CHO 细胞中多数高效表达的蛋白质均能正确地完成蛋白质的修饰，但也有例外。利用基因工程的方法可以增强蛋白质的翻译后加工的有效性及分泌效率。目前，蛋白质糖基化工程的策略主要涉及寡糖的生物合成过程，如通过基因活化

或引入编码糖基化转移酶或糖苷酶的基因，采用反义技术或其他方法封闭所不需要的糖基化形式等。

10.3　动物细胞反应过程关键技术

10.3.1　培养基

动物细胞能够在体外继续存活、生长和繁殖，其所处的培养环境十分重要，而这个环境多数是模拟细胞在机体内的生存环境，其中培养基就是这个环境中的重要组成，动物细胞培养基是体外细胞培养的重要因素。1955 年，研究人员提出了培养基的基本营养成分应是盐、氨基酸、维生素、糖和其他必需营养物的等渗的 pH 缓冲的混合物，以此提出了基本培养基 MEM 配方。在随后的发展过程中，基本培养基的配方不断被改进。根据培养基的来源及成分的明确程度，动物细胞培养基的发展大致可分为 3 个阶段：天然培养基阶段、合成培养基阶段、无血清培养基阶段。常用的动物细胞基本培养基有 MEM、F12、DMEM、DMEM/F12、RPMI1640、RDF、eRDF 等。虽然，不同培养基有着不同的组成，为了保证细胞的生长和繁殖，一些基本的物理性质及组成是基本相同的。

1. 培养基的物理性质

（1）pH：多数细胞系在 pH 7.4 下生长得很好。尽管各种细胞株之间，细胞最佳 pH 变化很小，但一些正常的成纤维细胞系以 pH 7.4 ~ 7.7 最好，转化细胞系以 pH 7.0 ~ 7.4 更合适。据报道，上皮细胞可在 pH 5.5 维持。为确定最佳 pH，最好做一个简单的生长实验或特殊功能分析。

酚红常用做 pH 指示剂。pH 7.8 呈紫色，pH 7.6 红色中略蓝色，pH 7.4 呈红色，pH 7.0 变橙色，pH 6.5 变黄色。

（2）缓冲：由于细胞在培养基中需要消耗营养物质，产生代谢产物，在培养的过程中，培养基的成分始终在发生变化，其中 pH 值的变化较为明显。细胞培养过程中，由于产生或释放 CO_2 和乳酸，引起 pH 的变化。一般动物细胞体外培养体系 pH 为 7.2 ~ 7.4，为了稳定 pH，可以在培养液中加入缓冲物。通常，$NaHCO_3$ 缓冲系统使用较多，虽然它在生理 pH 下的缓冲能力差，但由于它的毒性小，成本低，对培养物有营养作用，它仍比其他缓冲系统用得多。

（3）渗透压：多数培养细胞对渗透压有很宽的耐受范围。人细胞浆的渗透压约为 290mOsm · kg^{-1}，因而推测这是体外人细胞的最佳值，尽管这与其他细胞不同，实际上大多数细胞在 260 ~ 320mOsm · kg^{-1} 渗透压情况下生长是完全可行的。更高的渗透压通常会使细胞生长速率减缓，但也常可使蛋白产物的合成速率加快。

（4）温度：除了温度对细胞生长有直接作用外，由于低温下 CO_2 溶解度增加，很有可能由于缓冲剂的离子化和 p*ka* 上的变化，温度也会影响 pH。

（5）黏度：培养基的黏度主要受血清含量的影响，在多数情况下，对细胞生长没有什么影响。可是，每当细胞悬浮液要搅拌时，它变得非常重要。若在搅拌条件下细胞受到损害，那么用羧甲基纤维素、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮增加培养基的黏度，可以减轻细胞损害。在低血清浓度或无血清下，这一点非常重要。

（6）表面张力和泡沫：培养基的表面张力可用来促进原代细胞贴附到介质上，但很少

用某种方法控制它。悬浮培养中，用含 5% CO_2 的空气在含血清培养基中鼓泡，会产生泡沫。加入硅油消泡剂降低表面张力，有助于防止泡沫生成。

泡沫的作用还不清楚。泡沫会使蛋白质的变性速率增加。如果泡沫达到培养容器的顶部，增加了污染的危险。泡沫在液面上的破碎过程是能量快速释放的过程，会造成细胞的严重损伤。细胞具有轻度的疏水特性，使得其在气泡上升过程中向气—液界面聚集，并随气泡上升至液面，在气泡破碎时，加重了对细胞的损伤，如果泡沫很稳定，还会造成泡沫中细胞的营养缺乏。悬浮细胞培养过程中，气泡的作用是必须认真对待的，通常用改变通气方法或加入保护剂的方法来减少对细胞的损伤。

2. 培养基的基本组成 由于动物细胞对培养基的要求高，不同细胞系的要求也不尽相同，要尽可能提供与体内生活条件接近的培养环境。动物细胞培养基多使用人工配制的培养基，这种合成培养基很多已经是商品化的固定配方。虽然，它们的配方所含成分差别较大，但基本组成还是比较接近的。主要基本组成包括水、糖类、必需氨基酸、维生素、无机盐类、生长类因子及激素、结合蛋白质、贴附与伸展因子及其他附加成分等。

（1）水：细胞培养用的各种液体，都要用水来配制，对水的要求非常高。水中如果含有一些杂质，那对细胞的生产是十分不利的。通常细胞培养用的污染物标准可参考医药上注射用水标准，但原则上应高于注射用水标准。

（2）糖类：它提供细胞生长的碳源和能源，分解后释放出能量 ATP，糖类主要指葡萄糖。不同细胞对葡萄糖利用途径相似，在无氧条件下还产生乳酸等有机酸。

（3）氨基酸：不同种类的细胞对氨基酸的种类和浓度有不同的要求，但通常增加氨基酸的浓度可提高培养的细胞密度和产物产率。谷氨酰胺是体外动物细胞培养的重要碳源和能源。21 种氨基酸中至少有 12 种是必需氨基酸，包括精氨酸（Arg）、半胱氨酸（Cys）、组氨酸（His）、异亮氨酸（Ile）、亮氨酸（Leu）、赖氨酸（Lys）、蛋氨酸（Met）、苯丙氨酸（Phe）、苏氨酸（Thr）、色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）、缬氨酸（Val）。这些氨基酸必须在培养基中添加，才能满足细胞的生长。

（4）维生素：它是一类微量的小分子有机生物活性物质，既不是细胞的物质基础，也不是能量物质，而是维持细胞正常生理状态的一种重要生物活性物质，在细胞中多形成酶的辅基或辅酶，对代谢和生长起调节和控制作用。水溶性维生素包括 B 族维生素和维生素 C，脂溶性维生素包括维生素 A、D、E、K 4 种。

（5）无机盐类：胞内的无机盐是细胞代谢所需酶的辅基，同时保持细胞的渗透压和缓冲 pH 的变化。胞外无机盐对维持正常生长环境很重要。Na^+ 是重要的胞外阳离子，Na^+ 和 Cl^- 参与生理电活动，具有维持水平衡、保持渗透压和酸碱平衡的作用。离体培养为细胞提供足够的 Na^+ 和 Cl^- 是基本条件，一般为生理盐水的离子浓度（0.9% NaCl）。Ca^{2+}、Mg^{2+} 是细胞的构成成分，对细胞间的互黏稳定起重要作用。碳酸盐缓冲液是重要的体内缓冲体系，与 K^+、Cl^- 等在维持酸碱平衡方面具有重要作用。微量元素有 Fe、Zn、Cu、Mn、Co、Mo、F、Se、Cr、I 等是酶的组成成分，调节酶活力。

（6）生长因子及激素：胰岛素是最常用的激素，使用浓度为 $1 \sim 10\mu g \cdot ml^{-1}$，对细胞的生长有刺激作用。其他激素有促卵泡激素、甲状腺素、乳激素、生育酚等。细胞因子有表皮生长因子、成纤维细胞生长因子和神经细胞生长因子，根据不同细胞添加。为了细胞的贴壁生长，必须添加贴附因子，如纤维结合蛋白、胶原等。

脂类化合物对动物细胞培养是必需的，实验中类脂及其前体和血清常平行使用。添加的

蛋白质试剂主要有转铁蛋白，起离子载体的作用。有时用无机铁盐，如硫酸亚铁、柠檬酸铁、葡萄糖酸铁等代替转铁蛋白。

3. 血清　绝大多数细胞的体外培养需要在培养基中补充一定量成分不明确的生物性液体或组织提取液才能支持细胞的生长增殖，其中血清因来源丰富且易于保存而成为被最广泛采用的培养基添加物，常用的血清有小牛血清、胎牛血清、马血清和人血清。胎牛血清一般用于要求更高的细胞系。人血清用于一些人细胞系。有些人喜欢马血清，因为可以从同一马群中获得，各批次间常有更好的一致性。

血清是极其复杂的混合物，常含有食物物质、代谢产物、激素、血浆蛋白、破碎细胞释放物质（如血红蛋白和血小板的生长因子）、采血中引入的污染物。就蛋白质而言，血清中所含的蛋白质成分就不少于 150 种。由于历史原因，商业培养基大都是按添加血清来设计的，使用血清的技术也已很成熟，尽管使用血清有许多缺点，仍将其作为细胞培养基中重要的组成而普遍采用。

细胞培养基中血清的作用非常复杂，已知的作用有：①影响培养基的生理性质，如黏度、渗透压、扩散速率；②含有蛋白酶抑制剂，抑制消化时用的胰蛋白酶和细胞分泌的蛋白酶；③提供合成培养基中不含有的营养物用于细胞代谢（胆固醇）；④提供小分子物质的载体蛋白（转铁蛋白）；⑤提供细胞贴壁必需的因子；⑥含有酶系，转化培养基中的成分成为细胞能利用的形式或非毒性物质；⑦提供微量元素、激素和生长因子；⑧结合或中和培养基中的毒性物质；⑨结合和保护在过量时有毒性的营养物并缓慢释放它们；⑩提供白蛋白对细胞起保护作用，并防止对其他重要因子的非特异性吸附。

虽然，动物细胞培养基中多数要添加血清，但由于血清所含的成分复杂也给动物细胞培养造成了诸多不利：①血清非常昂贵，其费用占到培养基费用的 50%，致使生产成本大幅度提高；②血清中含有某些不利于细胞生长的毒性物质或抑制物质，对某些细胞的体外培养有去分化作用；③血清中大量成分复杂的蛋白质给疫苗、细胞因子、单克隆抗体等下游培养产物的分离纯化带来很大的困难；④批次与批次之间血清质量的差异，会影响细胞生长，最终影响产品质量；⑤血清易被支原体和杂质污染。正是由于血清的应用存在上述问题，促使人们对无血清培养基的研究和应用日益重视。

4. 无血清和无蛋白培养基　无血清培养基（serum free medium，SFM）是全部用已知成分组配的不加血清的合成培养基，通常在含有细胞所需营养和贴壁因子的基础培养基中加入适宜的促细胞生长因子，保证细胞良好生长，是最适合于制药生产的培养基。它提高了培养的质量，避免了使用血清带来的麻烦，已有各种无血清培养基上市。

1975 年，在培养基中用激素代替血清使垂体细胞株 Gh3 在无血清介质中生长获得成功，预示着无血清培养基的诱人前景。进入 20 世纪 80 年代后，新的无血清培养基不断问世，人们经过研究发现，只要在培养基中增加某些适于细胞生长的成分，如纤连蛋白、转铁蛋白、胰岛素和表皮生长因子等，不少细胞即能在无血清供应的情况下生长，尤其是 CHO、杂交瘤、骨髓瘤细胞以及 BHK 细胞等。某些细胞在无血清的条件下，其生长和抗体的产量甚至较有血清培养时高出数倍。另外，动物细胞培养应用无血清培养基的成功，还将为某些疫苗的生产降低成本。这些都足以说明动物细胞无血清培养基的研究和应用进入了新的时期。

目前，无血清培养基已进入第 3 代。第 1 代无血清培养基虽然不含血清，但含有大量的动物和植物蛋白质，如牛血清白蛋白（BSA）和动物的刺激激素等。虽然其总蛋白质量明显低于有血清培养基，但蛋白质含量依然很高。因此厂商致力于发展第 2 代无血清培养基，其主要特

点是完全不用动物来源蛋白，称之为无血清、无动物衍生蛋白。它的优点是既可降低生产成本，又能加快报批的速度，因为政府药品监管部门对产品是否用含无血清培养基生产相当关注。由于生物工程的要求，第 3 代无血清培养基近年已出现，即完全没有蛋白质或含量极低，称之为双无培养基，即无血清、无蛋白质的培养基。这带来下述几个方面的好处：首先是因为培养基全为化学已知物，因此细胞培养与生产很容易做到恒定；其次是细胞分泌的目的蛋白的分离纯化更为容易；最后是细胞培养基的成本大为下降，生产中品质管理更加容易。第 4 代无血清培养基是一种无血清、无蛋白质、又可以高温消毒的适合于许多种不同细胞生长的全能型培养基。

应用无血清培养环境进行动物细胞的规模化重组蛋白质表达生产已成为一种趋势。无血清培养基由于其组成成分相对清楚，制备过程简单，在现代生物技术学领域得到广泛应用。无血清培养技术也是阐明细胞生成、增殖、分化及基因表达调控的基础研究问题的有力工具。

近年的实践证明，使用无血清培养基，在细胞的生长速率和细胞密度及蛋白质的表达水平方面都不亚于血清培养，甚至在某些方面超过血清培养，而这正是评价细胞培养基的几个重要指标，无血清培养基尚存在不足的方面，但其显著的优势将使无血清培养技术逐步取代含血清细胞培养。无血清培养基已广泛地应用于细胞生物学、药理学、肿瘤学和细胞工程领域。无血清培养基的应用主要表现在以下几个方面：①研究细胞的分化条件。目前已有许多在含血清的培养基中不能保持原代细胞分化现象的细胞系，在无血清培养基中成功地保留着分化能力和分化现象。如人结肠癌细胞 LIMI1863 在无血清培养基的培养下保持着肾脏的转运功能。②用于激素、生长因子和药物等与细胞相互作用的研究。③用于从多种细胞混杂的培养中选择目的细胞，通过对无血清培养基中的某些成分的取舍，可抑制原代组织培养物中非目的细胞的过度生长，达到选择目的细胞的目的。④肿瘤病理学和病因学的研究。如用于研究致癌因子对细胞的影响，研究肿瘤细胞对可能触发正常细胞终末分化的外周信号的反应能力，或用于研究正常细胞与肿瘤细胞的生长和移行与基底膜信号的关系等。⑤用于生产疫苗、单克隆抗体和生物活性蛋白等生物制品。

无血清培养基通常添加生长附加成分，如激素与生长因子、低分子营养成分和转铁蛋白等，主要包括胰岛素、孕酮、硒酸钠、转铁蛋白等（表 10-4）。

表 10-4　无血清培养基中主要添加成分及作用

种　类	例　　子	主要成分作用
激素和生长因子	多肽类激素：胰岛素、生长激素、胰高血糖素等；甾体类激素：孕酮、氢化可的松、雄二醇等；多肽类生长因子：表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子等	胰岛素促进对葡萄糖和氨基酸的利用，及糖原和脂肪酸的合成，对细胞的生长具有刺激作用。氢化可的松可促进细胞贴壁和细胞分裂，在某些情况下会抑制细胞生长和诱导细胞分化。生长因子对维持细胞体外培养生存、增殖和分化起调节作用
结合蛋白	如转铁蛋白和白蛋白	转运蛋白与其受体及 Fe^{3+} 复合物结合使细胞获得微量元素铁，还具有生长因子的性质
贴壁和扩展因子	如纤连蛋白、胶原、聚赖氨酸和昆布氨酸	纤连蛋白和昆布氨酸促进细胞贴附伸展并影响细胞增殖和分化
低分子质量营养因子	如微量元素、维生素和脂类等	微量元素能消除过氧化物酶和氧自由基对细胞的损害；维生素参与代谢，抗氧化等

10.3.2　细胞培养的基本条件和常规操作

动物细胞培养过程中涉及一些具体的操作条件及操作技术，本小节将从动物细胞培养基本条件、细胞的消化、细胞计数、动物细胞冷冻保存和细胞培养的污染和控制等几个方面对其进行介绍。

1. 动物细胞培养基本条件

（1）细胞培养基的准备：合适的细胞培养基是体外细胞生长、增殖的最重要的条件之一，培养基不仅提供细胞营养和促进细胞生长增殖的基础物质，而且还提供培养细胞生长和繁殖的生存环境。

细胞培养基由于有些成分不很稳定，所以即使在灭菌的情况下也需要注意其保存并在有效期内使用。液体培养基应于 4℃冰箱避光保存，实验前放入 37℃预热。未加血清液体培养基有效期为 12 个月。液体培养基中的 *L*-谷氨酰胺会随着储存时间的延长而慢慢分解。如果细胞生长不良，可以再添加适量的 *L*-谷氨酰胺。干粉培养基避光保存在 4℃冰箱内，有效期为 36 个月。

（2）血清准备：目前来说，多数细胞培养基中还是添加血清的。大量购买血清前应对血清对细胞的生长能力的影响进行监测。对已购买的血清，必须储存于 −70 ~ −20℃，瓶装血清使用前解冻采用逐步解冻法，不可直接解冻，以免造成蛋白质凝集沉淀。

（3）细胞培养环境：体外培养的细胞由于缺乏对微生物和有毒物的防御能力，一旦被微生物或有毒物质污染，或者自身代谢物质积累，均可导致细胞中毒死亡。因此，无菌、无毒的操作和培养环境是保证细胞在体外培养成功的首要条件。在体外培养细胞时，必须保持细胞的生存环境无菌、无毒，并及时清除细胞代谢产物。

细胞培养是一种无菌操作技术，要求细胞培养室环境清洁、空气清新、干燥和无烟尘。细胞培养室的设计原则一般是无菌操作区设在室内较少走动的内侧，常规操作和封闭培养于一室，而洗刷、消毒在另一室。通常细胞培养需要用到的设施和设备有超净工作台、无菌操作间、培养箱、灭菌锅、离心机、显微镜等。

（4）培养器皿：一般实验室常用细胞培养器皿有培养瓶、培养板、培养皿等。器皿要求无毒、透明、有利于细胞黏附和生长的容器，常用一次性聚苯乙烯材料制品或中性硬度玻璃制品。常使用的器皿除上面提到的还有液体储存瓶、吸管、离心管、三角瓶等。

（5）恒定的细胞生长温度：培养的细胞对温度非常敏感，恒定的温度是细胞培养成功的关键之一。不同的细胞对培养温度的需要是不同的。通常细胞对低温的耐受力比对高温的耐受力强。适当地加入冷冻保护剂的细胞可在超低温下长期保存。

（6）合适的气体环境：气体是哺乳动物细胞生存的必需条件之一，所需气体主要有 O_2 和 CO_2，O_2 与细胞的氧化磷酸化，产生供给细胞生长增殖的能量和合成细胞生长所需用的各种成分。CO_2 既是细胞代谢产物，也是细胞生长繁殖所需成分，对维持培养液的 pH 的稳定作出贡献。

2. 细胞的消化　从原代组织中分离细胞或者对已培养的细胞进行传代培养，都需要对细胞进行消化，以获得解离的细胞。原代组织中分离细胞是将组织块分离（散）成细胞悬液，最常用的是机械解离细胞法、酶学解离细胞法以及螯合剂解离细胞法。通常情况是先机械分散后酶解聚。细胞暴露在酶中的时间要尽可能短，以保持最大的活性。通常利用的酶有胰蛋白酶（trypsin）、胶原酶（collagenase）和分散酶（dispase）等。对获得的细胞进行计

数、培养。

从原培养容器中对贴壁细胞进行传代培养，需要分离细胞，并要保持细胞完整性。在传代培养时需再次检测细胞的活性，细胞的活率应该超过 90%，对无血清培养基，应降低胰蛋白酶使用量。细胞消化的操作过程包括：①遗弃使用过的细胞培养基。②使用不包含有钙镁的平衡盐溶液或 EDTA 清洗细胞。③在培养瓶对着细胞的一面加入清洗溶液，通过转动培养瓶 1～2min 清洗细胞层，然后去除清洗液。④以每 $25cm^2$ 2～3ml 的量，加选择的消化液到培养瓶对着细胞的一面，确保消化液覆盖细胞层，在 37℃孵育培养瓶，轻轻摇动培养瓶，在 5～15min 内，细胞就会脱落。细胞分离需要的时间因细胞系不同而有所变化。仔细监测细胞分离过程，避免细胞受损伤。对难于从培养瓶基层分离的细胞系，可以轻轻敲打，以加速分离过程。⑤当细胞完全分离时，垂直放置培养瓶，让细胞流到培养瓶的底部。⑥在培养瓶中加入完全培养基，通过移液管在单层细胞表面反复吹打来分散细胞，计数并再次培养细胞。

3. 细胞的计数及活力测定 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，总细胞中活细胞所占的百分比叫做细胞活力。从组织中分离细胞一般也要检查活力，以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用。复苏后的细胞也要检查活力，了解冻存和复苏的效果。为了对活细胞计数，可将细胞与合适的染料结合，使其着色。活细胞能够阻止这些染料进入细胞内，从而将活细胞与死细胞分开，常用的染料有台酚蓝、伊红 Y 等。细胞计数可用血细胞计数板或 Coulter 计数器。前者适于样品量较少的情况，Coulter 计数器可以用于大量细胞样品计数，速度较快，但无法分辨活细胞和死细胞。

利用细胞内某些酶与特定的试剂发生显色反应，也可测定细胞相对数和相对活力。通常利用 MTT 法测定细胞相对数和相对活力。活细胞中的琥珀酸脱氢酶可使 MTT 分解产生蓝色结晶状甲瓒颗粒积于细胞内和细胞周围。其量与细胞数成正比，也与细胞活力成正比。因此，可依据产生的颜色的量表征细胞活力。MTT 法只能测定细胞相对数和相对活力，不能测定细胞绝对数。

4. 动物细胞冷冻保存和复苏 动物细胞冷冻保存的主要目的是保存种子细胞，以便随时取用。同时，冷冻保存是细胞长期保存的唯一方法，有利于减少细胞被微生物污染和细胞之间交叉污染的危险性，减少细胞因传代培养而引起的遗传变异和形态改变以及避免有限细胞系出现衰老或恶性转化。大多数细胞一般都可冷冻保存于 -130℃以下低温多年。这种细胞深低温保存的基本原理是在低于 -70℃时，细胞内的酶活性均已停止，即代谢处于完全停止状态，故可以长期保存。细胞低温保存的关键，在于通过 0～20℃阶段的处理过程。在此温度范围内，冰晶呈针状，极易导致细胞的严重损伤。

动物细胞的冷冻保存有几个关键的要素，其对保存的质量有较大的影响，例如冷冻温度的控制、冷冻培养基的组成、细胞生长期、细胞周期状态以及冷冻培养基中的细胞数和细胞浓度等。

在冷冻保存前，先测试细胞是否受到污染，准备好含有 5%～10% DMSO 的冷冻培养基，稀释去除培养上清液的细胞至细胞密度为每毫升（1～5）$\times 10^6$ 个细胞。室温平衡 15～60min，细胞先经过 -20℃冷冻，时间小于 60min，然后迅速转移至液氮罐中。24h 后可以取出一管冷冻细胞培养，测定细胞的存活率。

冻存细胞较脆弱，对其进行复苏要轻柔操作。冻存细胞要快速融化，并直接加入完全生

长培养基中。若细胞对冻存剂（DMSO 或甘油）敏感，离心去除冻存培养基，然后加入完全生长培养基中。大多数细胞在解冻 24h 内的存活率会下降，且达到最低点，可能是由于细胞冷冻保存过程中对细胞产生的损伤而导致的细胞的凋亡。24h 后，细胞则开始恢复，且以指数方式增加。

5. 细胞培养的污染途径和控制方法　按现代的观念，凡是混入培养环境中对细胞生存有害的成分和造成细胞不纯的异物都应该视为污染。根据这一概念，组织培养污染物应包括生物（真菌、细菌、病毒和支原体）、化学物质（影响细胞生存、非细胞所需的化学成分）、细胞（非同种的其他细胞）。其中微生物最为多见。另外，随着使用细胞种类增多，不同细胞交叉污染，尤其是 Hela 细胞的污染也时有发生。

1）污染途径

（1）空气：空气是微生物及尘埃颗粒传播的主要途径。空气流动性大，如果培养操作场地与外界隔离不严格或消毒不充分，外界不洁空气很容易进入并造成污染。因此，培养设施不能设在通风场所。无菌操作应在净化台内进行，工作时要戴口罩，以免因讲话、咳嗽等使外界污染进入操作面，造成污染。

（2）器材：各种培养器皿、器械消毒不彻底和洗刷不干净导致污染，另外需要对培养箱进行定期消毒，防止形成污染。

（3）操作：实验操作无菌观念不强，技术不熟练，使用污染的器皿或封瓶不严等，都可以造成污染。培养两种细胞以上时，操作不规范，交叉使用吸管或培养液、瓶等有可能导致细胞交叉污染。

（4）血清：有些血清在生产时就已经被支原体或病毒等污染，变成了污染源。

（5）组织样本：原代培养的污染多数来源于组织样本；取材时碘酒消毒后脱碘不彻底，可造成碘混入组织、细胞或培养液中，影响细胞生长。

2）污染对培养细胞的影响：由于体外培养细胞自身没有抵抗污染的能力，而且培养基中的抗生素抗污染能力有限，因而培养细胞一旦发生污染，多数情况下将无法挽回后果。细胞污染早期或污染程度较轻时，如果能及时去除污染物，部分细胞有可能恢复。但是，若污染物持续存在培养环境中：轻者致使细胞生长缓慢，分裂相减少，细胞变得粗糙，轮廓增强，细胞浆出现颗粒；严重者致使细胞增殖停止，分裂相消失，细胞质中出现大量堆积物，细胞变圆、脱壁。

细胞培养中，细胞间交叉污染并不罕见，多是由于在培养中操作时各种细胞同时进行，混杂使用器皿和液体所致，这种污染能使细胞的生长特性、形态特征等发生变化，有些变化较轻、不易察觉，有些可能由于污染的细胞具有生长优势最终压过原来细胞而导致细胞的生长抑制，最终死亡。常用观察细胞形态学、分析生长特性和核型、检测细胞的标志物等方法检测交叉污染的细胞。

3）污染的预防：防止污染，预防是关键，预防措施应该贯穿整个细胞培养的始终。从培养器皿的准备、开始操作前及操作过程中均需要注意操作的规范；对于已经获得的稳定细胞系及早冻存，重要的细胞株传代工作应由两个人独立进行；购入的未灭活血清应采取 56℃ 水浴灭活 30min，使血清的补体和支原体灭活；为了避免诱导抗药细菌，应定期更换培养系统的抗生素，或尽可能不用抗生素；对新购入的细胞株应加强观察，防止外来污染源；定期消毒培养箱等。

4）污染的排除：培养的细胞一旦污染应及时处理，防止污染其他细胞。通常高压灭菌

被污染的细胞，然后弃掉。如果有价值的细胞被污染，并且污染程度较轻，可以通过及时排除污染物，挽救细胞使其恢复正常。常用的排除微生物污染的方法有以下几种。

（1）抗生素排除法：抗生素是细胞培养中杀灭细菌的主要手段。各种抗生素性质不同，对微生物作用也不同，联合应用比单用效果好，预防性应用比污染后应用好。如果发生微生物污染后再使用抗生素，常难以根除。有的抗生素对细菌仅有抑制作用，无杀灭效应。反复使用抗生素还会使微生物产生耐药性，而且对细胞本身也有一定影响，因此有人主张尽量不用抗生素处理，当然，一些有价值的细胞被污染后，仍需要用抗生素挽救，在这种情况下，可采用 5 ~ 10 倍于常用量的冲击法，加入高浓度抗生素后作用 24 ~ 48h，再换入常规的培养液，有时可以奏效。

（2）加温除菌：根据支原体耐热性能差的特点，有人将受支原体污染的细胞置于 41℃中作用 5 ~ 10h（最长可以达 18h）杀灭支原体。但是 41℃对细胞本身也有较大影响，故在处理前，应先进行预试验，确定最大限度杀伤支原体而对细胞影响较小的处理时间。

（3）动物体内接种：受微生物污染的肿瘤细胞可以接种到同种动物皮下或腹腔，借动物体内免疫系统消灭掉微生物，肿瘤细胞却能在体内生长，待一定时间，从体内取出再进行培养繁殖。

（4）与巨噬细胞共培养：在良好的体外培养条件下巨噬细胞可以存活 7 ~ 10d，并可以分泌一些细胞因子支持其他细胞的克隆生长。与体内情况相似，巨噬细胞在体外条件下仍然可以吞噬微生物并将其消化。利用 96 孔板将极少数培养细胞与巨噬细胞共培养，可以在高度稀释条件下培养细胞、极大地降低微生物污染程度的同时，更有效地发挥巨噬细胞清除污染的效能。本方法与抗生素联合应用效果更佳。

10.3.3 细胞培养生物反应器

无论细胞工程采用何种技术手段，研究什么内容，其最终目的是利用动、植物细胞催化原料合成目的产物。细胞工程技术终究是在细胞反应动力学研究基础上的对活细胞的体外操作技术，整个反应过程是在可控制的情况下实施的，这种可操作性使得细胞工程技术发展衍生出生物反应器工程技术。

广义的生物反应器指利用微生物、植物、动物或人细胞，或者用专一性酶通过生物方法将原料转化为特定产品的容器，通常依据容器的性质和组成的不同将其分为发酵罐、动物表达系统、植物表达系统、昆虫表达系统以及细胞表达系统；狭义的生物反应器指使生物技术转化为产品、生产力的关键设备，其在生物反应过程中处于中心地位，特指发酵罐设备。事实上，通过生物反应器的概念，我们不难得到这样一个结论：每一个被培养的动物细胞、植物细胞、微生物都是一个独立的生物反应容器，它们利用培养基中的原料，在无菌条件下合成生物体本身、重要次生代谢产物（如黄酮、类萜、甾体及其苷、生物碱等）或生物制品（如酶、干扰素、生长因子、抗体等）等。所以，人工控制发酵罐条件实际上是间接地对每一个细胞生长、代谢的操纵。本部分内容主要针对动物细胞生物反应器即狭义的细胞培养生物反应器进行简单的介绍。

在动物细胞的培养过程中，细胞培养生物反应器是整个过程的关键设备，它要为细胞提供适宜的生长环境并决定着细胞培养的质量和产量。按照动物细胞的生长要求，具备低的剪切效应、较好的传递效果和流体力学性质是这类反应器设计或改进必须遵循的原则。

目前，动物细胞培养用生物反应器主要包括：转瓶培养器、塑料袋增殖器、填充床反应

器、多层板反应器、螺旋膜反应器、管式螺旋反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器、流化床反应器、中空纤维及其他膜式反应器、搅拌反应器、气升式反应器等。按其培养细胞的方式不同，这些反应可分为以下 3 类：①悬浮培养用反应器，如搅拌反应器、中空纤维反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器、气升式反应器。②贴壁培养用反应器，如搅拌反应器（微载体培养）、玻璃珠床反应器、中空纤维反应器、陶质矩形通道蜂窝状反应器。③包埋培养用反应器，如流化床反应器、固化床反应器。按照能量的输入方式，细胞培养生物反应器分为搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、固定床和流化床生物反应器、膜式生物反应器等。

1. 搅拌式生物反应器　它靠搅拌桨提供液相搅拌的动力，有较大的操作范围、良好的混合性和浓度均匀性，因此在生物反应中被广泛应用。但由于动物细胞没有细胞壁的保护，因此对剪切作用十分敏感，直接的机械搅拌很容易对其造成损伤，传统的用于微生物的搅拌反应器用作动物细胞的培养显然是不合适的。所以，动物细胞培养中的搅拌式反应器都是经过改进的，包括改进供氧方式、搅拌桨的形式及在反应器内加装辅件等。

一般情况下，搅拌式反应器还常伴有鼓泡，为细胞生长提供所需氧分。由于动物细胞对鼓泡的剪切也很敏感，所以人们在供氧方式的改进上做了许多工作。笼式供氧（cage aeration）是搅拌式动物细胞反应器供氧方式的一种，即气泡用丝网隔开，不与细胞直接接触。反应器既能保证混合效果又有尽可能小的剪切应力，以满足细胞生长的要求。结果表明笼式搅拌生物反应器除了能够大大减小对细胞的损伤，还能够很好地解决培养过程中的泡沫问题。日本报道了一个经过改进的搅拌式动物细胞反应器，整体呈梨形，搅拌桨置于反应器底部，在搅拌轴外装了一个锥形不锈钢丝网与搅拌轴一起转动。轴心处的鼓泡管在丝网内侧鼓泡，丝网外侧的细胞不与气泡直接接触。华东理工大学生化工程研究所开发的 CellCul-20 动物细胞培养反应器，采用了双层笼式供氧，提高了氧的传递系数。在 20L 的反应器中采用灌流工艺培养 Vero 细胞，连续培养 5d 细胞数增加 37 倍，密度超过每毫升 1×10^7 个细胞。

搅拌桨的形式对细胞生长的影响非常大，这方面的改进主要考虑如何减小细胞所受的剪切应力。研究人员对搅拌桨的形式作了改进，并在反应器内加装了辅件，实验证明改进后的反应器适用于对剪切应力敏感的细胞进行高密度培养。反应器采用了一个双螺旋带状搅拌桨（helical ribbonimpeller），顶部的法兰盖上安装了 3 块表面挡板。每块挡板相对于径向的夹角为 30°，垂直插入液面。挡板的存在减小了液面上的旋涡。这个反应器维持了较小的剪切应力，实验用于昆虫细胞的培养，最终的培养密度达到每毫升 6×10^6 个细胞，成活率大于 98%。

2. 气升式生物反应器（air lift bioreactor）　它是在鼓泡式生物反应器（sparged bioreactor）的基础上发展起来的，以气体上升为动力、由导流装置引导形成气液混合的总体有序循环。气升式生物反应器在细胞培养中应用非常广泛。它与机械搅拌式反应器相比，其优点是湍动温和均匀，且剪切应力小，放大容易，直接通气供氧，氧传递速率高，液体循环量大，细胞和营养成分混合均匀，适用于动、植物细胞的培养，特别适用于生产次生代谢产物的分泌型细胞。但此生物反应器的最大缺点是：当细胞高密度培养时，在高通气量的情况下，泡沫问题严重，影响细胞生长；在低通气量的情况下，则易造成培养液混合不均。研究人员在普通气升式发酵罐的基础上作了改进，通过改变流体特性，研制了球形冒泡生物反应器（balloon－type bubble bioreactor，BTBB）。该反应器呈圆柱形，中心是多孔的折流板。它的下面是喷嘴。空气从喷嘴喷出，从多空折流板的中央上升，在其外壁处下降，形成回流。实验表明，上升气流转向越快，则越有利于溶质的混匀及氧的传递速率的提高。

3. 固定床和流化床生物反应器

（1）固定床生物反应器：可用于贴壁依赖性细胞的培养，剪切应力小，可以无泡操作。同时，也可证实这种反应器适合于增殖悬浮细胞，如杂交瘤细胞。固定床反应器的特征是高的床层细胞密度，可减少无血清培养时的蛋白质用量。实验说明，用无蛋白培养基在固定床反应器中连续培养杂交瘤细胞可达几周，而同一细胞系在低剪切转瓶或15L搅拌反应器中，不添加转铁蛋白和胰岛素则不能维持。固定床反应器中的填充材料是惰性的玻璃、陶瓷或聚氨基甲酸乙酯等，通常是直径2~5mm实体或多孔球。培养基循环通过固定床，充氧器连接在循环回路中。刚接种的细胞长在填充物的表面，随着细胞增殖，细胞开始充满颗粒间的孔隙。固定床反应器有细胞培养所需的许多特征，如高细胞截留和灌注能力，无泡操作，放大简单。但是，其无法直接测定细胞的生长密度和存活率，现在可以通过间接地测定细胞的代谢参数间接估计这些参数。

（2）流化床反应器：它的基本原理就是使支持细胞生长的微粒呈流态化。这种微粒直径约500μm，具有像海绵一样的多孔性，可由胶原制备。再用非毒性物质增加其密度使之达到不小于$1.6g \cdot cm^{-3}$，以便它在高速向上流动的培养液中呈流态化。细胞就接种于这种微粒中，通过反应器垂直向上循环流动的培养液使之成为流化床，并不断提供给细胞必要的营养成分，细胞得以在微粒中生长。同时，新鲜培养液不断地被加入，而培养产物或代谢产物又不断地被排除。这种反应器传质性能很好，并在循环系统中采用膜气体交换器，能快速提供给高密度细胞所需的氧，同时排除代谢产物如CO_2。反应器中的液体流速足以使细胞微粒悬浮，却不会损坏脆弱的细胞。利用流化床反应器既可培养贴壁依赖性细胞，也可培养非贴壁依赖性细胞。流化床反应器放大比较容易，放大效应小，已成功地从0.5L放大至10L，用于培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。

4. 膜式生物反应器 例如高分子海绵体、复式管、堆叠层系统、螺旋塑胶膜及中空纤维等，可以较高密度培养动物细胞，其中中空纤维生物反应器系统的比表面积大，用途广泛，它既可以培养悬浮生长的细胞，也可培养贴壁依赖性细胞，细胞密度可高达每毫升10^9个数量级，只要控制系统不被污染，就能够长期运转。中空纤维能隔离细胞与介质或产物，可降低生产中产物分离的成本。

中空纤维反应器（hollow fiber bioreactor）由于剪切应力小而广泛用于动物细胞的培养。这类反应器由中空纤维管组成，每根中空纤维管的内径约为200μm，壁厚为50~70μm。管壁是多孔膜，O_2和CO_2等小分子可以自由透过膜扩散，动物细胞贴附在中空纤维管外壁生长，可以很方便地获取氧气。中空纤维反应器具有多种优点，但是由于对中空纤维的要求，也存在生产价格高，消耗量大，不宜重复使用，灭菌困难，不易清洗和维护，不易放大等问题。

研究人员报道了一个用于大规模培养动物细胞的径向流中空纤维反应器。该反应器内有一个垂直的中央分配管，外面由中空纤维管与分配管呈平行组成一个环状床层。培养液由中央分配管径向流过中空纤维床，细胞在中空纤维外壁贴附并生长。空气和CO_2的混合气体在中空纤维间与培养液成错流流过床层，向细胞提供氧分并维持一定的pH值环境，细胞的代谢产物随气流带出。在这个反应器中细胞生长的表面密度可达7.3×10^6个$\cdot cm^{-2}$。研究人员发明了一个可用于动物细胞培养的生物反应装置，由中空纤维反应器和灌流系统组成。液体通过泵在反应系统内循环，灌流系统补充或置换培养介质及移出代谢产物。细胞在中空纤维膜的一侧生长，培养介质在膜的另一侧通过扩散向细胞传递营养。该反应器能为细胞提

供一个温和的生长环境。

5. 其他类型的反应器　除上述类型的反应器外，一些其他类型的适于动物细胞培养的生物反应器也时有报道。研究人员设计了一个黏性泵生物反应器（viscous pump bioreactor），它以“三维流动”代替搅拌混合，提供较高的传质速率。反应器的底部是提供动力的流线型转盘，培养液在反应器中以水平运动和螺旋的纵向运动形成“三维流动”。由于转盘和反应器顶部都为流线型而没有锋利的边缘，所以产生的剪切应力很小。一美国专利介绍的一种膜式旋转细胞培养器，由一个培养室和一个供应室组成，中间隔有一层半透膜。营养物可以从供应室透过膜进入培养室，细胞代谢产物也可以通过膜进入供应室。培养器中的混合装置在培养器旋转时保证细胞在培养室中温和混合并稳定悬浮。培养室与氧源之间的气体渗透膜使氧分能透过膜扩散溶于液相。该装置产生的剪切应力很小，适合于细胞高密度培养。

研究人员报道了一个新型的动物细胞培养反应器（“see-saw” bioreactor）。反应器由两个独立的筒状培养室构成，底部用管路连通。通过培养室顶部的三通阀在压缩和放空间切换，培养液在培养室间作类似“拉锯”的运动。由于黏性的作用，液面下降时液体在器壁上拉伸成膜，增大了与空气的接触面积，有利于氧的传递。实验溶氧的实测值均比理论浓度高。反应器中没有搅拌和鼓泡的作用，所以对细胞的损伤很小。

此外，脉冲式生物反应器（pulsatile bioreactor）也是用在组织培养中的一种新型反应器。营养液通过脉冲灌流进入反应器，脉冲的频率和强度可调，借以模拟动物体内的生物应力。

10.4　动物细胞培养技术的应用

细胞培养技术自产生以来，在人类的生产、生活中作出了重要的贡献。动物细胞培养可从细胞水平上帮助人类揭开生、老、病、死的规律，探索优生、抗衰老、防治疾病的手段或途径，人为地诱导细胞遗传性状的改变，使其向更有利于人类和自然界的方向发展。尤其随着细胞生物学和分子生物学的相互渗透，分子克隆技术与细胞培养技术相结合，在阐明基因的结构与功能，基因在细胞生长和分化中的作用，以及细胞癌变机制等方面起了重要作用。因此，对活细胞的研究仍是当前生命科学的中心问题之一。除了在理论研究方面的应用外，动物细胞培养生产生物制品为人类在预防和治疗疾病方面也作出了突出的贡献。

10.4.1　细胞生物学基础研究

单个细胞克隆便于对细胞生物学的基础理论进行研究，如细胞形态和结构、细胞器及其功能、遗传物质、核型、变异、细胞转化、生长周期等，离体培养细胞技术便于进行环境因素、药物等单因素及多因素的影响作用研究，并探索其作用的机制等。

10.4.2　细胞作为毒性实验及安全性实验的工具

很多化学物质、射线等对机体的毒性实验及其产生不良影响的安全性调查等，不能用人体试验，用动物实验成本也很高，而细胞培养技术为其提供了最简易而又可靠的方法，并为研究毒性机制提供了良好的实验对象。例如，细胞培养在神经毒理学研究领域中起着越来越重要的作用，这方面的资料呈指数增加趋势。在细胞培养的模型系统中，实验变量可被严格控制，较使用整体动物更价廉。新技术的发展可使许多设想成为可能，如使神经元和星形细

胞生存期延长；可将所选择的基因加入或从培养细胞中取出；点突变可解释酶重要催化部位和调节蛋白的作用；可利用反义 RNA 调节蛋白质的转录水平等。

10.4.3 细胞培养在病毒学及病毒疫苗生产中的应用

细胞是分离病毒的最好和最方便的基质，为病毒的增殖提供了场所，体外培养细胞无抗体及非特异拮抗物质的影响，而且对病毒的敏感性较体内细胞为高；病毒感染指标容易观察，同时也便于用分子病毒学技术进行检测。利用细胞培养可准确地进行病毒定性和定量的研究。在制备减毒灭活疫苗和诊断用抗原时，也离不开细胞这一病毒增殖的场所。

动物疫苗、鸡胚疫苗、细胞培养疫苗，是多种疫苗发展的三部曲。利用细胞培养技术生产病毒疫苗是病毒疫苗发展的一个重要时期，产生的疫苗有黄热病、流感、乙型脑炎、脊髓灰质炎、麻疹等疫苗。虽然，基因工程疫苗是现在疫苗的发展趋势，但有些疫苗仍不能通过这种方法进行疫苗的制备。细胞培养是一项比较可行、简单制备疫苗的策略。细胞培养使生物制品学有很大的发展，可以获得纯系病毒，给活疫苗选毒种提供了最佳条件。制备各种死活疫苗，尤其加工制备浓缩提纯疫苗，大大提高了效力，减少了反应，取代了许多用动物或鸡胚制备疫苗。近年发展起来的悬浮细胞培养、微载体细胞培养和中空纤维培养，已经走上了大批量、工业化、自动化培养技术道路。

在疫苗制备上，细胞培养相对于动物培养、鸡胚培养仍有许多得天独厚的优点：①细胞没有特异性的免疫力。细胞在离体组织培养后，不存在免疫作用，易被病毒感染。②病毒敏感范围广，有些病毒具有严格的宿主及组织特异性，但离体的细胞培养，对病毒的敏感范围比较广泛。如脊髓灰质炎病毒可以在非神经细胞上生长，对原始人羊膜细胞不敏感，但对原代培养的羊膜细胞则敏感，并有细胞病变。肠道病毒、呼吸道病毒等大都能在猴肾细胞培养上生长。③在分离病毒时，细胞培养可大量接种标本，从而增加了分离概率。④提高了收获物的纯度，易于加工处理。⑤细胞培养瓶间的差异比较小，大大地提高了实验的准确性、重复性。

目前常用的细胞培养的细胞类型及所制备的疫苗类型如表 10-5 所示。

表 10-5 细胞培养制备疫苗所用的细胞类型和疫苗类型

细胞类型	疫苗类型
人成纤维细胞	甲型肝炎病毒（HAV）
CHO 细胞（中国仓鼠卵巢细胞株）	乙型肝炎病毒（HBV）
原代地鼠肾细胞	乙型脑炎病毒、狂犬病病毒
人二倍体细胞 WI-38	狂犬病病毒
非洲绿猴（Vero）细胞	狂犬病病毒、灰质炎病毒、流行性出血热病毒

10.4.4 细胞工程学研究手段的建立及应用

利用细胞融合及杂交技术，进行细胞工程的研究与开发。如生物反应器的开发研究，将生物活性物质的基因导入动物受精卵，随后从动物组织、体液分泌物中获得外源基因的表达产物（如获取人生长激素）。经大量培养，以每毫升 10^7 个细胞浓度计算，每日从培养液中可收获近 1mg 生长激素，而用化学提取法生产生长激素时，用羊脑为材料，从 50 万只羊脑

中仅能提取 5mg，而且不是纯生长激素。

利用细胞培养技术建立的细胞工程研究手段已经转化为实际的生物制品。动物细胞培养技术生产产品是 20 世纪 80 年代以来生物技术工业中一个十分重要的组成部分。动物细胞可以自然合成或在外源基因指导下合成许多分泌产物，其中许多被鉴定为很有潜力的治疗药物。某些细胞合成的干扰素和酶、细胞工程方法建立的杂交瘤细胞合成的单克隆抗体、基因工程细胞株合成的 EPO、tPA 等都是典型的例子。有的细胞本身就是产品，用于皮肤或骨髓移植、基因治疗等。

细胞培养技术生产天然蛋白质，首先要获得能够合成所需蛋白质的均一细胞系，但该类细胞的蛋白质产率通常很低，培养成本高，工作量大。从而限制了动物细胞技术在蛋白质生产中的应用，仅仅用于制备干扰素和尿激酶等少数蛋白质和疫苗。20 世纪 70 年代初期的两次科学革命是动物细胞技术的工业化扩大应用的主要转折点。首先是杂交瘤技术的建立，即将产生特异抗体的小鼠脾 B 淋巴细胞和具有无限增殖能力的小鼠骨髓瘤细胞发生融合得到杂交瘤细胞。该技术实现了稳定、高质和大量生产特异抗体的梦想。遗传工程或重组 DNA 技术推动了动物细胞技术的加速发展。重组 DNA 技术通过将编码相关蛋白质信息的基因转入细胞，可使细胞进行大规模的增殖。该技术使先前不能生产或不能大量生产的蛋白质得到大规模制备，同时也可高效生产修饰或改性蛋白质。而基因转移技术有助于筛选适合工业化生产的安全高效的特定细胞系。

细胞培养在现代生物技术中应用也是十分广泛的，如基因分离，基因测序与表达，基因转移与重组，癌基因研究等。在转基因动物的研究中也被广泛应用，如将生长激素的基因导入小鼠受精卵中，获得生长快、个体大的转基因巨型小鼠。在培育优良品种时，研制具有抗病基因、抗病毒基因等转基因动物、植物，前景良好。在器官移植寻找器官供体方面，有人将人的基因转给猪受精卵，培育出带有人类基因的猪，用猪肾供病人进行肾移植，这种做法正在试验中，如成功将会给移植外科带来突破性进展。

10.4.5　遗传疾病的产前检查

用羊膜穿刺术获得的羊水中的胎儿细胞进行培养，便可在妊娠早期，诊断胎儿是否患有先天性遗传病，少量胎儿脱落细胞是能分裂的，经 2 ~4 周生长，形成显著单层上皮样细胞，可按常规制备染色体。另可检测甲胎蛋白（AFP）等，可于产前检测出几十种代谢病与遗传病，较准确地指导优生、优育。

10.4.6　细胞培养药物测试

利用一种可观察与检测的指标来测试某药物作用体外培养细胞的变化，如某细胞生长因子对细胞的促分裂作用，某激素促体外培养胰岛细胞分泌胰岛素的作用，某药物杀伤细胞的细胞毒作用等。临床常做肿瘤细胞对抗癌药物的药敏测试，以指导临床抗癌药物的使用及配伍。

总之，作为生物工程基础之一的细胞培养技术，已经在多方面研究和生产、生活中发挥出越来越重要的作用。它在生命科学界的一个个突破性成就，正在造福于人类，并正显示出不可估量的效益。

10.5 植物细胞反应原理

细胞学说和细胞的全能性是植物组织和细胞培养的理论基础。理论上即使是已经高度分化的植物细胞也包含着该物种的全部遗传信息，具备发育成完整植株的遗传能力。体外培养植物组织或细胞只要给定合适的条件，细胞即能够生存、生长和繁殖。然而，植物细胞与微生物细胞由于结构及组成的不同，其在培养过程中对环境的敏感性增加，细胞具有聚集成团的倾向，与微生物细胞培养有一定的差异。下面将从培养体系的流变学特性、植物细胞培养体系的混合、剪切应力对悬浮培养细胞的影响、植物细胞培养动力学等几个方面对植物细胞反应原理进行介绍。

10.5.1 培养体系的流变学特性

培养液是由液相和固相（细胞以及不溶性的培养基组分）构成的多相系统，在通气培养时还有气相存在，构成了一个复杂的流体系统。在介绍培养体系的流变学特性之前，首先了解一下植物细胞培养基的基本组成。

1. 植物细胞培养基的基本组成 植物细胞培养与动物细胞培养相比，其最大的优点是植物细胞在合成培养基上生长。其培养基的成分由无机成分、有机成分、植物激素、抗生素和固体支持材料等组成。几种基本培养基配方见表 10-6。

表 10-6 几种常用培养基配方

化合物名称	培养基含量（$mg \cdot L^{-1}$）						
	MS	White	B5	WPM	N6	Knudson C	Nitsch
NH_4NO_3	1650						720
KNO_3	1900	80	2527.5	400			950
$(NH_4)_2SO_4$			134		2830	500	
$NaNO_3$					463		
KCl		65					
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440		150	96	166		166
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$		300		556		1000	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	720	246.5	370	185	250	185
K_2SO_4				900			
Na_2SO_4		200					
KH_2PO_4	170			170	400	250	68
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8			27.8	27.8	25	27.85
Na_2 – EDTA	37.3			37.3	37.3		37.75
Na_2 – Fe – EDTA			28				
$Fe_2(SO_4)_3$		2.5					

续表

化合物名称	培养基含量（$mg \cdot L^{-1}$）						
	MS	White	B5	WPM	N6	Knudson C	Nitsch
$MnSO_4 \cdot H_2O$				22.3			
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	7	10		4.4	7.5	25
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	3	2	8.6	1.5		10
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025		0.025				0.025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.03	0.025	0.025			
MoO_3							0.25
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25		0.25	0.25			
KI	0.83	0.75	0.75		0.8		10
H_3BO_3	6.2	1.5	3	6.2	1.6		
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$		16.5	150				
烟酸（Vpp）	0.5	0.5	1	0.5	0.5		
盐酸吡哆醇	0.5	0.1	1	0.5	0.5		
盐酸硫胺素	0.1	0.1	10	0.5	1		
肌醇	100		100	100			100
甘氨酸	2	3		2	2		
pH	5.8	5.6	5.5	5.8	5.8	5.8	6.0

1）无机成分：植物细胞培养基中的无机成分主要包括大量元素和微量元素。

大量元素指植物生长发育所需的浓度大于 0.5$mmol \cdot L^{-1}$的营养元素，主要有 N、P、K、Ca、Mg、S 等。其中，N 是植物矿质营养中最重要的元素，分为硝态氮（NO_3^-）和氨态氮（NH_4^+），这两种状态的氮都是植物组织培养所需要的。当作为唯一的氮源时，硝态氮的作用要比氨态氮好得多，但在单独使用硝态氮时，培养一段时间后培养基的 pH 会向碱性方向转变，若在硝酸盐中加入少量铵盐，则会阻止这种转变。缺磷时植物细胞的生长和分裂速度均会降低。K、Ca、Mg 等元素能影响植物细胞代谢中酶的活性。

微量元素指植物生长发育所需浓度小于 0.5$mmol \cdot L^{-1}$的营养元素，主要有 Fe、Mn、Cu、Mo、Zn、Co、B 等。它们用量虽少，但对植物细胞的生命活动却有着十分重要的作用。其中，Fe 是用量较多的一种微量元素，对叶绿素的合成和延长生长等起重要作用。Fe 元素不易被植物直接吸收且易出现沉淀。因此，通常在培养基中加入以 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 Na_2-EDTA（螯合剂）配制成的螯合态铁（Fe-EDTA）可以减轻沉淀，提高利用率。

大量元素和微量元素都是离体组织生长发育必不可少的基本的营养成分，含量不足时都会造成植物缺素症。

2）有机成分

（1）糖类：它提供外植体生长发育所需的碳源、能量，使培养基维持一定的渗透压。蔗糖是最常用的糖类，可支持许多植物材料良好生长。其使用浓度一般为 2%～5%，常用

3%，但在胚培养时可高达 15%，因蔗糖对胚状体的发育起着重要作用。在大规模生产时，可用食用白糖代替，以降低生产成本。

（2）维生素类：完整植株在生长过程中能自身合成各种维生素，可满足自身各种代谢活动的需要。但在离体培养中则不能合成足够的维生素，需要另加一至数种维生素，才能维持正常生长。常用的维生素有维生素 B_1、维生素 B_6、烟酸（VPP）、维生素 C 等，一般用量为 $0.1 \sim 1.0mg \cdot L^{-1}$。除叶酸需要用少量氨水先溶化外，其他维生素均能溶于水。维生素 B_1 对愈伤组织的产生和生活力有重要作用；在低浓度的细胞分裂素下，特别需要添加维生素 B_1、维生素 B_6 才能促进根的生长；VPP 与植物代谢和胚的发育有一定关系；维生素 C 有防止组织褐变的作用。

（3）肌醇：又叫环已六醇，能够促进糖类物质的相互转化和活性物质作用的发挥，以及能够促进愈伤组织的生长以及胚状体和芽的形成，对组织和细胞的繁殖、分化也有促进作用。另外，对细胞壁的形成也有作用。但肌醇的用量过多，则会加速外植体的褐化。肌醇使用浓度一般为 $100mg \cdot L^{-1}$。

（4）氨基酸：它是良好的有机氮源，可直接被细胞吸收利用，在培养基中含有无机氮的情况下，更能发挥其作用。常用的氨基酸有甘氨酸、谷氨酸、半胱氨酸以及多种氨基酸的混合物（如水解乳蛋白和水解酪蛋白）等。

（5）天然有机复合物：组织培养所用的天然有机复合物的成分比较复杂，大多含氨基酸、激素等一些活性物质，因而能明显促进细胞和组织的增殖与分化，尤其是对一些难以培养的材料有特殊作用。常用的天然有机复合物有椰乳、香蕉泥、马铃薯提取物、酵母提取液、苹果汁、番茄汁等。由于这些复合物营养非常丰富，所以配制和接种培养基时一定要十分小心，以免引起污染。

3）植物激素：它是培养基的关键性物质，对植物组织培养起着决定性的作用。包括以下几类。

（1）生长素类：常用的植物生长激素有 IAA、IBA、NAA、2，4－D，其活性强弱为 2，4－D > NAA > IBA > IAA，一般它们的活性比为：IAA∶NAA∶2，4－D = 1∶10∶100。生长激素在细胞培养中的作用是协助细胞分裂素促进细胞分裂和伸长，刺激生根，对愈伤组织的形成起关键作用。通常其添加浓度为 $0.05 \sim 5mg \cdot L^{-1}$。除了 IAA 不耐热和光，其他大部分的生长素对热和光较稳定，能够直接进行高压灭菌处理。

（2）细胞分裂素类：该类激素是腺嘌呤的衍生物，常见的有 6－BA、KT、ZT、2－ip 等。其活性强弱为 2－ip > ZT > 6－BA > KT。在植物组织培养中，细胞分裂素有促进细胞分裂和分化，延长组织衰老，增强蛋白质合成，抑制顶端优势，促进侧芽生长及显著改变其他激素作用的特点。培养基中细胞分裂素的浓度一般为 $0.05 \sim 10mg \cdot L^{-1}$。所有的细胞分裂素对光、稀酸和热均稳定，它们经高温高压灭菌后性能仍稳定。

（3）赤霉素（GA3）：它主要促进植物伸长、节间伸长、分生组织芽生长，刺激在培养中形成的不定胚发育成小植株，诱导淀粉的合成，打破休眠和促进开花等。它与 IAA 一样不耐热，需在低温条件下保存，使用时采用过滤灭菌法加入。如果采用高温、高压灭菌，赤霉素将有 70% ～100% 失效。因此，一般情况下，在组织培养快速繁殖生产中不常用赤霉素。

4）抗生素：在细胞培养中使用的抗生素有青霉素、链霉素、庆大霉素等，用量一般为 $5 \sim 20mg \cdot L^{-1}$。添加抗生素可防止菌类污染，减少培养过程中材料的损失，节约人力、物

力和节省时间，尤其是在植物组织或细胞遗传转化中常常需要用到抗生素。但同时添加的抗生素种类及浓度也需要考虑对细胞的影响。

5）固体支持材料：固体培养细胞通常要在培养基中添加一些固体支持物。琼脂是使用较广的一类支持材料。琼脂是一种由海藻中提取的一类多糖，本身并不给培养物提供任何营养。它是固体培养时最好的固化剂。除了琼脂外，还有玻璃纤维、滤纸桥等都可以作为支持材料。

固体培养除加入一些固体支持物外，有些细胞培养中还需加入活性炭，它吸附一些有害物质，减轻其不利影响，如能够吸附一些酚类物质，可减轻组织的褐化等。

2. 培养液的流变学特性　培养液的组成十分复杂，其中水所占的比例最大。除了溶解于水的各种营养成分及细胞的代谢产物外，还有大量的细胞、构成培养基的不溶性物质等固相物存在。一般在培养液中的液相部分黏度很低，随着其中细胞浓度的增加，培养液的黏度也相应增大。

当培养液中的颗粒呈球状或接近球形，而且其浓度较低时，悬浮液为牛顿型流体，其黏度可根据 Einstein 公式计算：

$$\mu_s = \mu_L(1 + 2.5\Phi) \tag{10-5}$$

式中：μ_s 为悬浮液黏度（$Pa \cdot s^{-1}$）；μ_L 为悬浮液中纯液相黏度（$Pa \cdot s^{-1}$）；Φ 为颗粒的体积分数，量纲为 1。

当颗粒的体积分数较大时，以上线性关系不再成立，提出以下关系式：

$$\mu_s = \mu_L(1 + 2.5\Phi + 7.25\Phi^2) \tag{10-6}$$

此外，还有不少其他经验关系式，如：

$$\mu_s = \mu_L(1 - \Phi)^{-2.5} \tag{10-7}$$

$$\mu_s = \mu_L(1 - 1.35\Phi)^{-2.5} \tag{10-8}$$

当培养液黏度与细胞浓度的关系明确时，可以通过测定培养液的黏度来确定细胞浓度。

大多数植物细胞培养物在高浓度下是黏性的，主要是由密集培养中高固体含量引起的，而培养液本身的黏度通常是较低的。高浓度的细胞悬浮液可成为非牛顿型流体，用于描述植物细胞悬浮物的幂定律方程包括宾汉塑性、假塑性和凯松流体。人们常用表观黏度来描述培养液的流变学特性。在植物细胞培养体系中，黏度系数受到颗粒尺寸和细胞浓度的极大影响，流动特性指数受影响不大。

培养液的流变学特性对混合和氧气传递影响很大。氧传递系数随着黏度的增加而下降，例如，在假黏性流体中，剪切应力越高，表观黏度越低。这种情况下，在搅拌桨区因高剪切混合使得气泡分散较好，而远离桨区呈现高的表观黏度，导致混合与氧传递较差。由于植物细胞易聚集成团，随着细胞的生长，氧传递降低，因此其流变学特性不同于单细胞微生物。

通过改变培养基的渗透压浓度可以改变培养液的流变学特性。在典型的植物细胞间歇培养中，使用蔗糖作为碳源，开始时培养基中蔗糖水解使得渗透压浓度增加，随着培养物中营养物质的消耗，渗透压逐渐降低并在稳定期趋于零。这种低的渗透压情况下会出现细胞增大的现象。尽管大细胞可能拥有一个较大的储存室，但是它们更容易被剪切损伤。此外，高比例的大细胞通常使得培养液的黏度增加，并可能因为高固相含量而表现出高的屈服应力。单个细胞体积的增大也会导致后期培养液表观黏度的显著增加，尽管此时生物量浓度已经降低。

多数研究显示细胞悬浮培养也呈非牛顿型流体特征，在某些系统中，还可以看到培养液

随细胞浓度的增大而从牛顿型向非牛顿型的转变。当植物细胞浓度较小时，体系接近牛顿型流体，当细胞浓度超过某一值时，黏度系数和表观黏度剧烈增加，体系远离牛顿型流体。在两相培养系统中，当有机溶剂浓度小于10%时，对细胞悬浮培养体系的流变性仅有较小的影响，且促进体系向牛顿型流体靠近。

3. 研究培养液流变学特性的常用方法 由于细胞团的存在，使得选择合适的测定植物细胞悬浮培养物流变学特性的方法显得尤为重要。表10-7给出了一些常用的测量装置和细胞体系。旋转圆柱黏度计是最常用于测定植物细胞悬浮物的装置，但是它们并不完全适合微粒悬浮物，因为微粒的振动与重力沉降会导致所处区域的相分离，引起悬浮物分布不均匀，甚至引起细胞团的破碎。这些问题可以通过使用合适的桨体系来部分地减轻，主要包括涡轮桨、螺带搅拌桨以及锚式搅拌桨，但是它们的剪切速率的操作范围有限。在测量中由于搅拌的原因，使用旋转圆筒黏度计会引起大细胞团逐渐破碎，从而导致接触变形和屈服应力的出现。

到目前为止，虽然对植物细胞悬浮培养体系的流变学特性进行了大量的研究，但是认识还是很肤浅的。尽管已经知道了大多数的植物细胞培养物在高浓度下有很大的黏度，聚集体颗粒（细胞团）、颗粒间相互作用，高的细胞浓度以及胞外多糖的分泌最终导致整个发酵液具有高黏性，植物细胞悬浮液与许多微生物悬浮液一样，表观黏度依赖于细胞的浓度，但是悬浮细胞与聚集颗粒的形态学对悬浮液表观黏度的影响仍需要进一步研究，因为用细胞浓度作为黏度的关联因子可能掩盖了培养过程中因细胞团尺寸与水含量不同造成的影响。除此之外，培养液的流变学特性还与培养体系的混合和氧传递密切相关，这也是反应器设计与放大所需要考虑的重要因素。

表10-7 悬浮培养物的流变学特性

细胞体系	生物量浓度（$g \cdot L^{-1}$）	特性	黏度计
罂粟	<14.5	牛顿型	Brookfield黏度计；改造的Stormer同心圆桶黏度计
烟草			
间歇培养	9.0	假塑性，$n=0.6$	Brookfield黏度计；改造的Stormer
半连续培养	7.9	牛顿型	同心圆桶黏度计
烟草	≤13	假塑性，$n\approx0.7$	Brookfield黏度计
紫苏	<20	宾汉塑性	Brookfield黏度计
曼陀罗	≤450（鲜重）	凯松塑性	改造的Weissenberg流变计、Contraves流变计、Brookfield黏度计
海巴戟	≤450（鲜重）	假塑性，$n\approx0.8$	双螺带搅拌桨
长春花	≤27	假塑性，$0.1<n<0.9$	双螺带搅拌桨
柘树	≤15	假塑性，$n\approx0.53$	Brookfield黏度计
长春花	≤15	假塑性，$n\approx0.53$	Brookfield黏度计

n表示流动特性指数

10.5.2 植物细胞培养体系的混合

在植物细胞培养体系中，气液传递（特别是氧气在培养基中的溶解率和在液体中的传递速率）、营养物在细胞与培养液之间的传递都是十分重要的体系混合问题。简单的套用化工的液固传递理论是不合适的，需要对其进行深入的研究，建立准确的定量模型。

1. 营养物传递方式 植物细胞培养体系中，营养物通过细胞膜的传递机制与其他生物

的相同，均有 3 种情况：被动传递、主动传递和易化传递。传递的方式主要是依据传递的能量及是否需要载体来区分的。

2. 反应器内的混合　反应器内有效的混合能促进营养物质在气－液相细胞之间的传递，可为植物细胞的生长及代谢提供均一的生理条件。但是，由于植物细胞对剪切很敏感，反应器内的剪切速率会给植物细胞带来损伤，降低细胞的活性。高密度培养液的非牛顿型流体特性限制了反应器内有效的热量和质量的传递，导致反应器内温度和营养物浓度分布不均。

反应器的操作在很大程度上取决于气－液两相的混合状况，通常采用混合时间来反映反应器内的混合情况，利用流数或功率消耗等参数来描述。一维轴向扩散模型被广泛应用于反应器中混合状况的研究，但在实际培养中，混合时间往往比轴向扩散系数更为重要。混合时间即为示踪子加入反应器后达到一定程度的混合时所需要的时间，它是直接描述培养基中营养物成分均匀程度的参数。

3. 氧需求和供应　氧气从气相到细胞表面的传递是植物细胞大规模培养的一个基本问题。由于植物细胞培养的高密度与高黏度特性，氧气的传输会受到阻碍，因此，在培养过程中，细胞的生长常受培养液中溶氧的影响。溶氧浓度常与搅拌强度、气泡分散程度、培养基的溶氧水平、容器内水压有关。向培养液提供氧气的方式常采用喷射空气或纯氧，气泡在上升过程中，氧气溶于培养液中，然后传递到细胞。

（1）氧气传递阻力：氧气一般是通过注入空气或纯氧进入发酵罐的。气泡在培养基质中传递的过程中，氧气溶解于培养基中，供细胞消耗。氧气传递的总过程以及其他养分传递的过程可由静态膜理论确定的各单个传质阻力来描述。在传质过程中，有关养分的供给和利用、代谢产物的分泌和转移的阻力有多种。氧气传递的总阻力等于单个阻力的总和。单个阻力对总阻力的贡献或其重要性取决于培养基中气体和液体的流体力学特性、温度、培养基组成和流变学特性、代谢活力及细胞密度、界面特性以及其他因素。这些阻力包括：①从气相主体到气液界面的气膜传递阻力 $1/K_G$；②气液界面的传递阻力 $1/K_I$；③从气液界面通过液膜的传递阻力 $1/K_L$；④液相主体的传递阻力 $1/K_{LB}$；⑤细胞或细胞团表面的液膜阻力 $1/K_{LC}$；⑥固液界面的传递阻力 $1/K_{IS}$；⑦细胞团内的传递阻力 $1/K_A$；⑧细胞壁的阻力 $1/K_W$；⑨反应阻力 $1/K_R$。

（2）溶氧浓度：与微生物相比，植物细胞代谢慢，需氧量较低，一般需要 1～10mmol · L^{-1} · h^{-1}的氧气，这种特性要求设计低剪切率的生物反应器以满足植物细胞大规模培养的要求。尽管由于植物细胞的凝结速率快而对氧的需求量低，但为了确保混合良好，在气升式生物反应器中还是要求有合理的空气流动速率，尤其是在高细胞密度和高流体黏度情况下，传质效率大大降低。同时，除考虑细胞生长对氧气的需求外，代谢产物合成时对氧气的消耗在某些情况下会显著地高于细胞生长时的需氧量的。但并不是氧浓度越高，细胞生理状况越好，不同的细胞对氧的消耗规律是不一样的，细胞对氧需求有一个最优值。

（3）CO_2 的影响：已经研究证明，在气升式生物反应器中采用高曝气速度，植物细胞的生长就会减缓，原因之一可能是除氧气外的其他的气体成分（如 CO_2）对植物细胞的生长也具有重要的作用。在无光合作用下，细胞也能固定一定浓度的 CO_2。在高通气速度情况下，CO_2 及一些主要的挥发性物质很可能从培养基中逸散出来，从而导致细胞生长速度的减慢。因此，植物细胞生长应在各种气体成分相协调的环境中进行。

10.5.3　剪切应力对悬浮培养细胞的影响

植物细胞培养已在多种生物反应器中进行，如滚瓶、转桶、搅拌罐、鼓泡塔、空气提升

罐。在摇瓶和滚瓶中培养细胞和生产代谢产物已获成功，但在稍大的搅拌生物反应器中，植物细胞次生代谢产物合成能力却难以提高，甚至有时会丧失合成能力。通常认为造成这种情况的一个主要原因是植物细胞的个体大，细胞壁僵脆和具有大的液泡，使其对剪切应力敏感。因此，研究剪切应力对细胞培养的影响是设计植物细胞培养反应器需要解决的一个重要问题。

细胞培养过程中剪切应力的产生是由固－液作用、气－固作用和固－固相互作用而产生的，培养于搅拌式生物反应器中的植物细胞时刻都受到剪切应力的作用。

1. 剪切应力对植物细胞的影响 流体剪切应力对植物细胞的影响并非单一或单方面的，而是正反两个方面都存在。剪切应力对植物细胞的积极影响表现为增加通气，保持良好的混合状态和细胞分散性，在适合的条件下，甚至可以提高细胞产率和增加次生代谢产物产量。多数情况下，则呈现负作用，造成细胞损伤，影响细胞形态、代谢及聚集状态等。剪切应力对植物细胞的损伤影响表现如下。

（1）形态改变：剪切应力作用使植物细胞或细胞团大多表现为机械损伤（或细胞团体积变小）。

（2）胞内化合物的释放：导致 pH 下降的胞内化合物的释放可作为细胞受到剪切应力损伤的标志。一些细胞系在剪切应力作用下有释放有机碳和蛋白质的现象。尽管实验表明有机碳的释放在具剪切应力耐受性的细胞中也有发现，不能肯定是受剪切应力造成细胞损伤，但在狗牙花（*Tabernaemontana divaricata*）细胞的培养中，蛋白质的释放显示了剪切应力与细胞损伤的密切联系。在烟草细胞培养中，随剪切应力增加，酚类化合物的释放量增加。

（3）代谢和产率的改变：在培养海巴戟细胞过程中增加剪切应力时，蛇根碱的产量降低了 70%。研究人员在 12L 搅拌式生物反应器培养长春花细胞时发现，Ruston 涡流推进器转速达 $300r \cdot min^{-1}$时，生物碱累积速度增加，当转速为 $300 \sim 700r \cdot min^{-1}$时，生物碱累积速度明显下降。应该指出的是，以代谢和产率的改变作为细胞损伤的特征仍缺乏足够的科学依据。因流体荷载的变化是由旋转系统的速度或通气的改变引起的，进而改变剪切系统的传质状态。培养液中溶解的氧、CO_2 等对细胞代谢均有影响。一旦液体混合状态发生改变，氧气和营养的供应状态即发生改变，部分细胞可能会缺乏某些养分，从而影响细胞代谢。因而代谢和产率的改变不足以用于衡量细胞的剪切应力损伤。

（4）活性丧失：细胞损伤可能导致细胞失活并最后死亡。在多数情况下，细胞有修复损伤的能力，因此受损伤的细胞仍可成活。细胞活性指细胞具有在适合的环境中生长和分裂的能力，通常活性与离子相对不可渗透的细胞膜的存在相关。检测细胞活性通常用染色法（FDA，TTC）、介电常数测定法 、四唑盐类氧化还原测定等。

2. 剪切应力对细胞影响的可能机制 悬浮培养的植物细胞常常聚集成团，大小可达数毫米，这些细胞个体间未完全分离，通过胞间连丝进行细胞质的交换。因植物细胞团的体积大到可与微小气泡的大小相比，因此它们对泡沫产生的剪切应力相对不敏感。培养的植物细胞对搅动产生的流体力敏感性要比对泡沫破碎引起的剪切应力敏感性高得多。

以前关于植物细胞流体机械敏感性的研究大多都在类型、规模、搅拌器速度各异的搅拌式生物反应器中进行。在搅拌反应器中培养植物细胞，为获得充足的营养和氧气，会受到两种剪切应力的影响，靠近搅拌桨的细胞将遇到周期性转动引起的变化涡流力，但在生物反应器的主体内，细胞主要受随时间变化而变化的层切力的影响。

剪切应力对细胞产生的影响除了体现在宏观形态、细胞壁组成方面外，与细胞骨架及信

号转导也有一定的关系。作用于细胞表面受体的机械应力在维持细胞组织形式上起着关键作用。所有的细胞都有预应力结构，在其细胞骨架内产生机械力，并对胞外基质施加张力。由于许多的代谢机制都与细胞骨架相关，所以，细胞骨架的结构变化可引发生物化学信号的逐级变化。另外，植物细胞表面受体也能调节跨膜力的转移和调控组织的形成。高剪切应力作用下，植物细胞会出现酸化现象，引起胞内外一系列的反应应答，激活或抑制一系列的生理、生化反应。

3. 对生化反应器设计的指导　植物细胞通常具有剪切应力敏感性，高的搅拌速度对细胞生长有害，低搅拌速度可以使细胞团分散，尤其在生长后期细胞分泌黏厚的多糖等物质时，对细胞生长繁殖有利。低于引起细胞损伤而又足以提供有效的液相混合和气体扩散的剪切应力水平被认为是评估反应器设计的重要指标。如果将搅拌速度控制在两个极端之间，则可为细胞培养寻找到合适的剪切速率。通过研究剪切应力对植物悬浮培养的影响，确立剪切应力和植物细胞培养的关联性，并有选择地寻求具有剪切应力抗性的细胞，将为大型悬浮细胞培养生物反应器的设计提供指导。为获得反应器中缓和的流场及良好的混合性能，对搅拌桨的结构和类型的改进也必须参考剪切应力这个指标。

10. 5. 4　植物细胞培养动力学

对植物细胞培养过程中的细胞生长、底物消耗和产物生成等进行量化分析，即植物细胞培养动力学的研究，有利于合理的设计其培养策略，对反应器的开发和利用将起到积极的推动作用。植物细胞培养动力学研究包括生长动力学和产物生产动力学两部分内容。

1. 生长动力学　与微生物相比，植物细胞生长很慢，最快的倍增时间一般在 20h 左右，生长较慢的则为 100h 或更长的时间。这样慢的生长速度决定了植物细胞培养周期较长，增大了细胞培养的成本，同时容易造成污染。当然在实际生产中注意培养技术的应用、发酵罐的结构和培养物的保存会有助于减少污染，已有多个运行多月而不被污染的中试规模的反应器例子。

通常，在分批培养的生长过程中，细胞经历了对新环境的适应、迅速生长、生长与代谢趋于稳定这几个生理过程，这几个过程分别称为迟滞期、指数生长期（细胞数及生物量对特定的基质的比生长速率为最大值）、静止期和衰亡期。

图 10-5 中曲线表示细胞鲜重随培养时间的变化。图中显示南方红豆杉细胞的生长周期约为 30d，细胞在生长的第 7 天左右进入指数生长期，在第 18 天左右进入静止期。

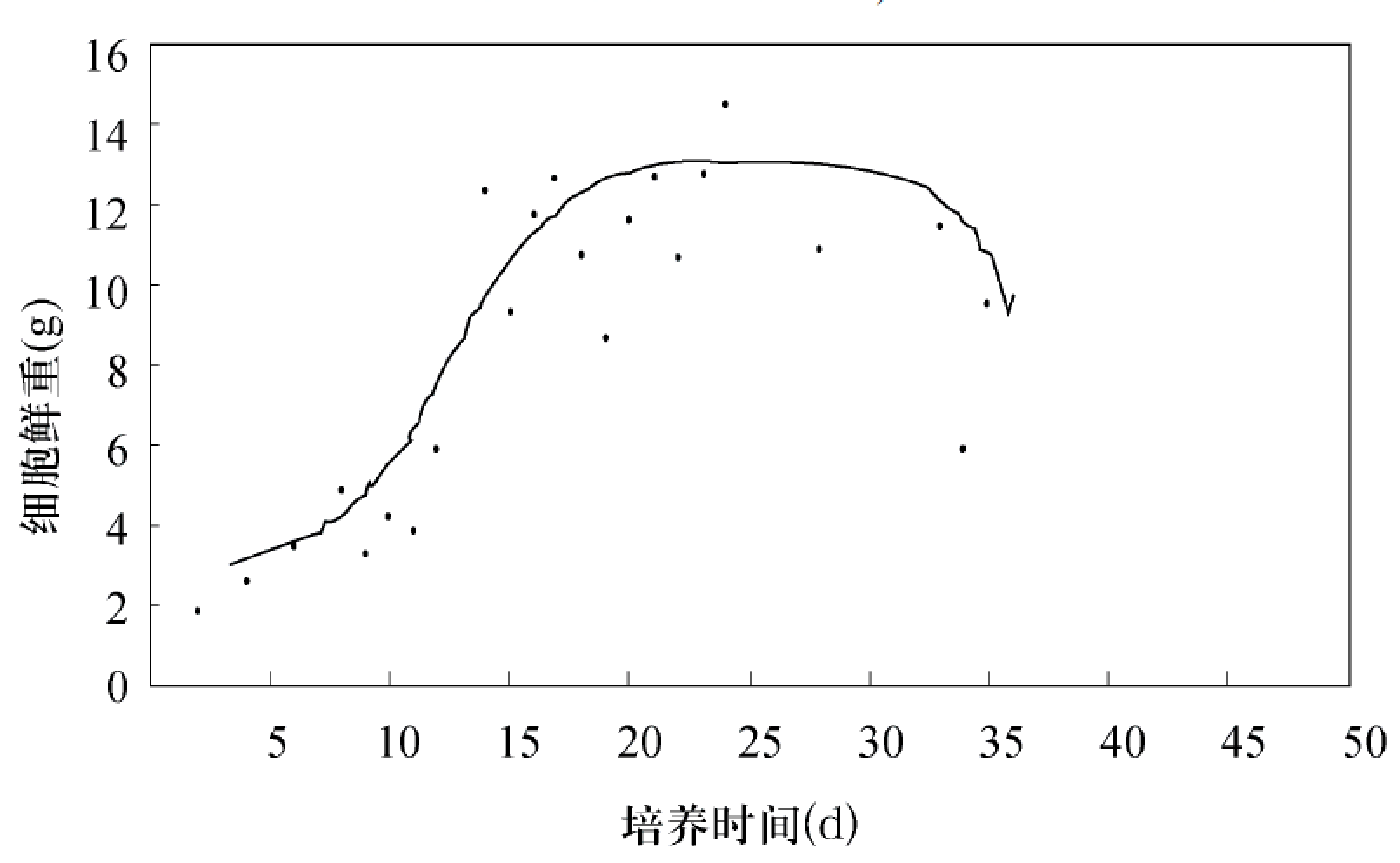


图 10-5　摇瓶悬浮培养南方红豆杉细胞的生长曲线

在指数生长期，细胞生长的各种营养物质充足，并且在迟滞期期间细胞已经为细胞的生长、分裂做好了充分的准备工作，在指数生长期，细胞以最大的生长比速率增长。生物量的增加用细胞量或细胞数的倍增时间 t_d 来表示，它是一个常数。

指数生长期后的减速生长通常是由于一种或多种必需营养物的耗尽或抑制性产物或副产物的积累所造成的。对于不同原因造成的细胞比生长速率减小，分别用不同的模型描述。当比生长速率随细胞质量增加而减小时，将出现更多适合于高密度培养的方程。

但是，植物细胞培养技术经历了几十年的发展，目前对其培养动力学的数学描述还比较缺乏。最初植物细胞培养的数学模型的建立是在细菌等微生物培养过程动力学模型的基础上发展起来的。在传统的微生物发酵过程中通常都是以一个简单的生物量组分来进行模型化，因此都是非结构化的，如 Monod 模型、Nyholm 模型及其 Leudeking-pipet 模型等，这些类型的模型通常都只能够考虑一些单组分的变化情况，而不能够考虑到植物细胞组分的多样性和细胞在培养过程及其代谢过程中变化的复杂性，如次生代谢产物的生成和细胞生长以及细胞在代谢过程中其他中间物质之间的相互转化的复杂关系等。因此这类模型不能够预测植物细胞培养过程中的很多行为，对于植物细胞的放大培养的指导性也十分有限。

随着对植物细胞培养过程研究的深入进行以及植物细胞代谢过程的明朗，对植物细胞培养的多样性也有了较多的认识，从而开始运用复杂的数学模型——结构化数学模型来描述植物细胞的培养过程。由于结构化数学模型考虑了培养细胞组分的多样性及其之间以及细胞与环境之间的关系，因此能够较精确地描述植物细胞的培养过程。这类模型对于分析细胞内的代谢调控很有价值，能够为培养过程提供更加清晰、更加定量的依据，其分析结果对于细胞培养过程的优化具有较强的指导性。目前已经有 4 种结构化数学模型运用于植物细胞培养的研究之中。

第一类模型是由研究人员在 1987 年提出的一个基于两种代谢中间物的动力学模型，用于解释细胞生长及与生长相关的产物合成之间的相互作用；1989 年又提出植物细胞处于细胞团的小环境中，其生长受中间代谢产物控制的模型，该模型预测在细胞生长过程中存在一个迟滞期。这类模型关键在以细胞培养中间代谢产物的生成和释放行为为依据，建立模型来解释细胞生长及与生长相关代谢产物之间的关系。

第二类模型把细胞的存活率引入了建模过程中，分析了细胞活性与细胞生长、底物消耗以及代谢产物的形成之间的相互关系。1989 年，研究人员提出了一个新的模型，在这个模型中考虑了细胞鲜重和存活率两个新的变量，这种模型能够预知细胞的膨胀和溶解过程。1990 年又提出了一个能够区分分裂细胞和非分裂细胞的生长模型。1998 年，在 1989 年提出的模型的基础上，研究人员在假设只有存活细胞生成产物多糖，底物消耗不用于维持细胞生长的前提下提出了一个植物细胞悬浮培养生成多糖的动力学模型，并通过 *Symphytum officinal* L. 的悬浮培养确定其多糖的合成属于生长相关型。

第三类模型属于考虑底物吸收及其活化机制的结构化模型。1992 年以细胞吸收培养基中的物质（如蔗糖等）以及其在细胞内的代谢为基础，通过一定的假设和简化，建立了考虑细胞生长、产物生成以及细胞呼吸作用的结构化数学模型，通过对细胞结构化的组成物、次生代谢产物的形成和细胞呼吸作用的检测来研究细胞在培养过程中内部的相互作用，并且将生长竞争型和非生长竞争型次生代谢产物区分开来。这个模型第一次说明了底物吸收和活化机制，模型的预测与实验有一定的相符合性。在 2000 年以培养基中碳源在培养过程中所经历的途径为依据，研究人员建立了紫草细胞悬浮培养的结构化动力学模型来描述细胞的培

养过程，参数优化的结果使模型能够较好地反映培养体系的变化情况。这种结构化模型较之1992 年建立的模型更加简单，而且参数较少容易检测，有较强的实用性，紫草细胞悬浮培养的结构化动力学模型将在后面的内容中介绍。2003 年，以同样的方法对红豆杉细胞培养建立了相应的模型，其实验结果也证明了该模型能很好地描述培养过程。对两种细胞培养成功建模，证明了该模型对于植物细胞培养过程动力学行为描述具有一定的通用性。

第四类模型主要考察了在细胞培养过程中其他重要盐类物质如磷酸盐和钙盐等对细胞培养生长或产物形成的影响。1993 年，研究人员提出了一个关于长春花细胞在不同磷酸盐水平下进行分批培养的结构化模型，模型不仅成功地描述了批式培养时细胞在不同磷酸盐浓度下的生长情况，而且对细胞在恒化器中的培养情况也有较好的预见性。研究人员也提出了一个考虑钙盐和磷酸盐对咖啡细胞悬浮培养的影响的结构化模型，能够预见生物碱的形成速率，与实验结果具有很好的一致性。1999 年，以磷酸盐与细胞生长和代谢产物的生产的关系建立了高山红景天致密愈伤组织颗粒悬浮培养的结构化动力学模型，该模型能够计算并预测接种量、接种物“年龄”及培养基中初始磷酸盐浓度对高山红景天致密愈伤组织生长与红景天苷的影响，模型基本能够反映高山红景天致密愈伤组织悬浮培养的动力学规律。

南方红豆杉细胞悬浮培养的结构化动力学模型实例：在测定和分析南方红豆杉细胞悬浮培养动力学的实验基础上，以培养基中的碳源在培养过程中所经历的途径为依据，建立了合理的结构化动力学模型来描述细胞的培养过程，参数优化的结果使模型能够较好地反映培养体系的变化情况。

（1）模型分析：培养基中的碳源为蔗糖，其在胞外被水解为葡萄糖和果糖，二者进入细胞内部。碳源在细胞内的代谢途径有 3 条：合成细胞物质、维持细胞活动及合成产物。细胞物质可分为结构物质与中间物质。糖在整个代谢过程所经历的途径如图 10-6 所示。

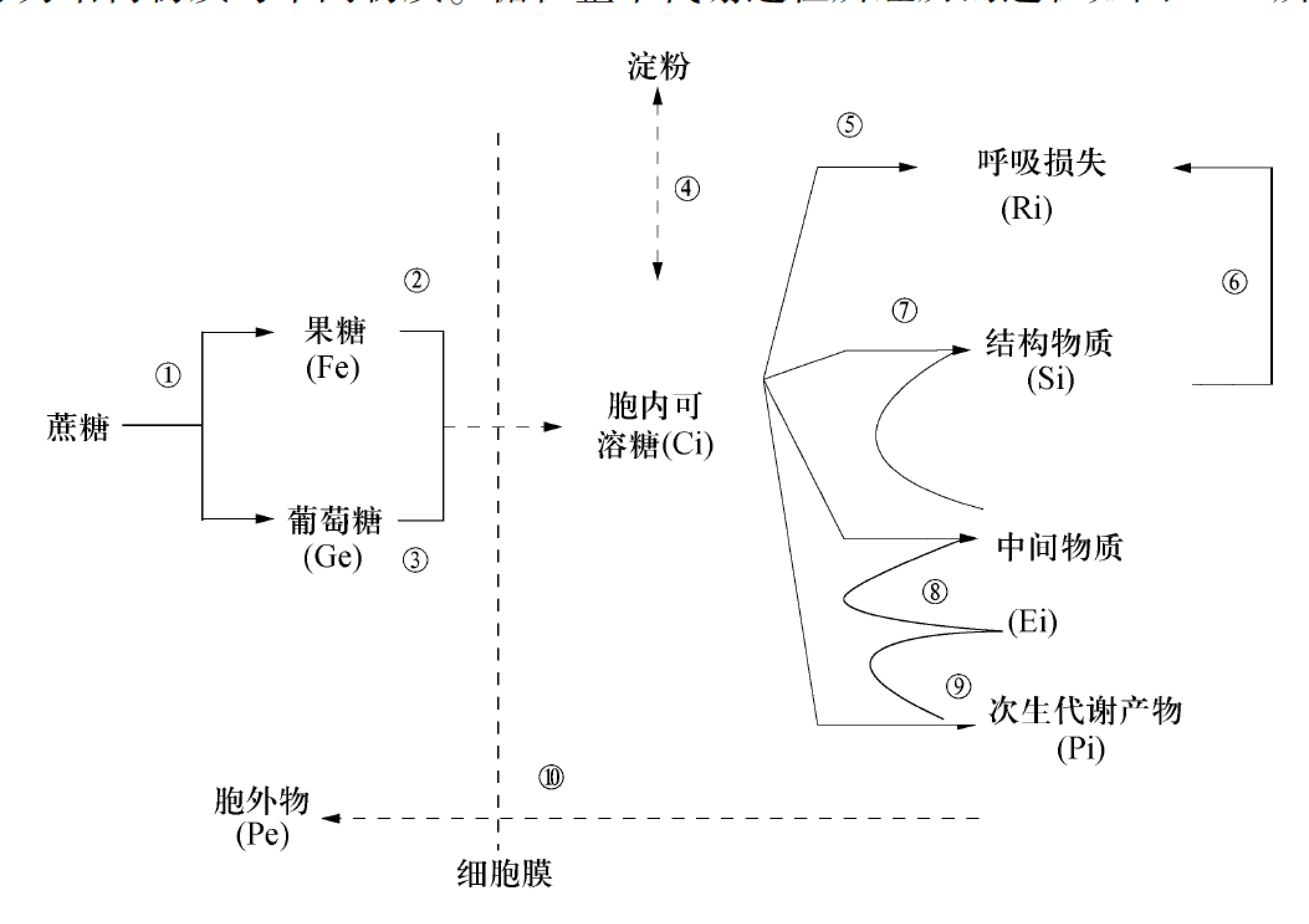


图 10-6　悬浮培养紫杉醇细胞碳源消耗生物学模型

①为胞外的蔗糖在酶的作用下，水解为葡萄糖 Ge 和果糖 Fe 的过程；②、③分别为果糖和葡萄糖进入细胞内部的过程；④为胞内葡萄糖和淀粉之间的转化；⑤、⑥分别描述的是用于维持细胞活动的呼吸消耗和细胞结构物质 Si 的内源呼吸消耗；⑦为胞内总的可溶性糖转化为结构物质 Si；⑧为胞内可溶性总糖合成中间物质 Ei；⑨为 Ci 转化为次生代谢产物紫杉醇 Pi；⑩为部分产物 Pi 渗漏到培养基中，形成胞外产物 Pe 的过程

（2）模型的确立：对间歇培养体系的任一组分 j，由物料平衡可知其生成速率为

$$\sum_{k=1}^{n} r_{k,j} = \frac{1}{V} \times \frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t}(V\bar{c}_j),\ j=1,\ 2,\ \cdots,\ n \tag{10-9}$$

以 $c_{j,i}$ 与 $c_{j,e}$ 表示胞内与胞外组分各自基于生物相体积 β 与非生物相体积 α 的浓度，令

$$c_{j,i} = \beta \frac{\bar{c}_{j,i}}{V} \tag{10-10}$$

$$c_{j,e} = \alpha \frac{\bar{c}_{j,e}}{V} \tag{10-11}$$

（3）模型参数求解：将组分 Ge 、Fe 、Ci 、Ei 、Si 、Ri 、Pi 与 Pe 各自的生成速率 $r_{k,j}$ 的表达式分别代入式（10-9），可得到微分方程组。最终通过质量平衡、参数测定、模型参数的求解和优化、参数灵敏度分析得到拟合曲线。图 10-7 为由模型计算结果得出的紫杉醇积累浓度的拟合曲线。由该曲线可见，模型能够很好地反映细胞生长后期代谢产物积累的情况。

采用结构模型来描述植物细胞的生长与次生代谢产物的代谢，通过测定与分析细胞内组分的变化，能够更深入地研究植物细胞培养的内在规律；同时可根据模型的描述，针对细胞所处的培养的不同阶段，采取不同的优化培养策略，从而分别满足细胞生长和产物代谢的需要，实现对整个培养体系的优化操作。

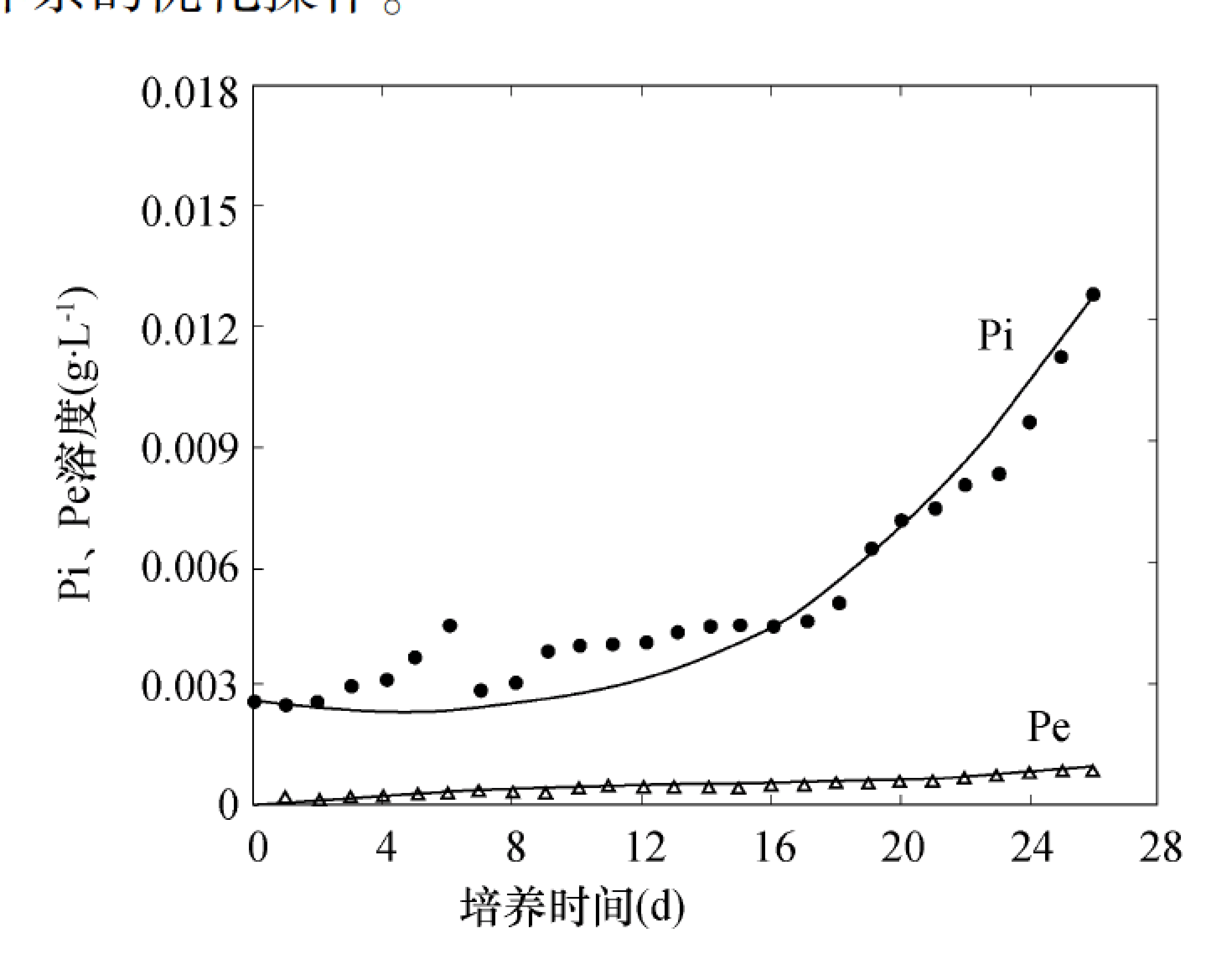


图 10-7　悬浮培养南方红豆杉细胞胞内外紫杉醇的拟合曲线

—：计算数据；●：胞内紫杉醇含量实验数据；△：胞外紫杉醇含量实验数据；
Pi：胞内紫杉醇含量；Pe：胞外紫杉醇含量

2. 产物生产动力学　大多数来自植物的目的产物是次生代谢产物。次生代谢速度比初生代谢速度低得多，因此产量普遍很低。在成批培养中，植物细胞的生长与产物合成动力学关系一般有 3 种类型：一是生长耦联型，即产物的合成与细胞的生长呈正相关，这种动力学通常与初生产物的合成有关；二是部分耦联型，即产物只有在细胞生长下降时才能合成，细胞处于指数生长期时，次生代谢产物含量下降，但细胞生长停止时，产物合成也停止；三是非生长耦联型，即产物只有在生长停止时才能合成。在离体培养条件下，生长与合成之间一般不相关联，合成过程通常是在植物细胞增殖开始降低，甚至停止时进行，或者在细胞从对数生长期向静止生长期转移时进行，这样，促进生长和生物量生产的培养条件并不一定能够提高次生代谢产物产量，有时甚至降低次生代谢产物的生产水平。

以上描述的 3 种动力学类型只不过是产物合成的理想模式，事实上，由于细胞培养系统较复杂，细胞生长和次生代谢产物的合成极少单独符合某一种模式，特别是在较大的细胞群体中，由于各细胞所处的生理阶段不同，细胞生长和产物合成是群体中部分细胞代谢的结果。此外，不同环境条件对产物合成的动力学也有很大的影响。因此，对细胞代谢产物合成动力学的了解是获得更多目的产物的前提之一。

10.6　植物细胞反应过程关键技术

10.6.1　细胞固定化

植物细胞较微生物细胞、动物细胞相比，具有个体大、细胞壁僵硬且具有较大的液泡等特点，因此对悬浮培养过程中的剪切应力十分敏感。有关剪切应力对植物细胞的影响已在前一节中介绍。利用细胞固定化技术可以有效地解决这一问题。1978 年研究人员首次成功的利用固定化的海巴戟、毛地黄和长春花生产次生代谢产物，目前已有 50 多种植物细胞成功地实现了固定化培养。

植物细胞固定化培养较悬浮培养具有多种优点：①有利于非耦联生长的植物细胞次生代谢产物的合成；②改善传质；③生长和生产阶段可以有效地分开；④改变了细胞生长的微环境；⑤减小培养体系中的剪切应力；⑥降低生产成本。固定化植物细胞生长速度一般低于悬浮培养细胞的生长速度，细胞位置的固定使其所处的环境类似于在植物体中所处的状态，相互间接触密切，可以形成一定的理化梯度，有利于次生代谢产物的合成，这就决定了固定化植物细胞次生代谢产物产量高于悬浮培养的细胞。再者，在游离细胞培养过程中，产物主要积累在胞内，而固定化培养植物细胞可使产物分泌到胞外，这对于连续培养来说是非常有意义的。当然，植物细胞固定化也有不足之处，如增加了处理固定化过程的费用，增加了过程设计和操作的复杂性等。

由于植物细胞所具有的特点，对其进行固定化只有用最温和的固定化方法才有可能成功，依据不同的需求，设计不同的固定化条件和方法。通常，按照固定载体与作用方式的不同，植物细胞固定化方法可分为 4 种类型：吸附法（载体结合法）、包埋法、交联法和共价结合法。此外，还有自固定法和表面固定法等。

（1）吸附法：又叫载体结合法，指载体和细胞间通过物理吸附或离子键合作用结合在一起，实现固定化。吸附法可分为物理吸附和离子吸附 2 种：前者使用具有高度吸附能力的硅胶、活性炭、多孔玻璃、石英砂和纤维素等吸附剂将细胞吸附到表面，使之固定化；后者根据细胞在解离状态下因静电引力而固着于带有相异电荷的离子交换剂上，如 DEAE-纤维素、DEAE-sephadex、CM-纤维素等。此法操作简单，反应条件温和，载体可以反复利用，但结合不牢固，细胞易脱落。

（2）包埋法：将植物细胞用物理方法包埋在各种载体之中。根据载体材料和方法的不同，包埋法可分为凝胶包埋法和半透膜包埋法两种。即将细胞包埋在凝胶等物质内部的微孔中或由各种高分子聚合物制成的小球内。包埋法操作简单，条件温和，对细胞活性影响小，制作的固定化细胞球强度高，是目前研究最广泛的方法。

（3）交联法：交联法（架桥法）不用载体，它利用双功能或多功能试剂，直接与细胞表面的基团（如氨基、羟基、巯基、咪唑基等）发生反应，形成共价键来固定细胞。常用

交联剂有戊二醛、甲苯二异氰酸酯、双偶氮联苯等。这种方法结合强度高，稳定性能好，经得起 pH 值和温度的剧烈变化，但化学反应激烈，对细胞活性影响很大，往往会毒害活细胞，所以交联法的应用受到一定限制，实际中常与其他方法联合使用。

（4）共价结合法：细胞表面功能团和固相支持物表面的反应基团之间形成化学共价键连接，从而成为固定化细胞。该法细胞与载体结合紧密，使用过程中不易脱落，但反应激烈，条件较难控制，往往容易造成细胞的死亡，应用并不广泛。

针对固定化培养模式有专门的用于固定化培养的生物反应器，通过优化固定化条件实现目的产物的大量合成和释放。

固定化植物细胞在生物转化方面已有众多的应用实例。如在手性药物的合成方面，研究人员利用固定化胡萝卜细胞对前手性底物酮酯、芳香酮和杂环芳酮进行对映选择性还原；研究人员利用固定化烟草细胞将前手性双酮酯和苯甲酰吡啶进行对映选择性还原；研究人员用固定化长春花细胞作用于外消旋物，得到手性吡啶醇。在天然药物的合成方面，研究人员用海藻酸包埋丹参愈伤组织细胞，连续生产隐丹参酮和丹参酮ⅡA。运用固定化长春花细胞合成阿玛碱，与游离细胞相比，海藻酸钙包埋细胞的产量是游离细胞的 176% 。在对现有药物的修饰改造方面，固定化植物细胞可以对现有的药物进行结构修饰，可改进它们的生物活性谱。最常用的转化反应是羟基化和糖基化。例如，利用海藻酸钙包埋固定化希腊毛地黄细胞及希腊毛地黄毒苷细胞，生产异羟基毛地黄苷。

固定化植物细胞培养技术起步较晚，但意义特殊。特别是利用固定化植物细胞生物转化技术以及代谢途径工程的分子水平研究可以更好地研究基因和酶的属性，可以在不同层次加速生物转化在生产实践和新药开发中的应用。固定化植物细胞转化系统也为工业化生产植物性天然药物开辟了一条新途径，但仍处于发展阶段。例如，固定化方法的完善、产物的释放以及如何控制固定化细胞处于不分裂状态、易污染、操作技术难度大、接种量大造成的成本高和反应器的设计不成熟等问题限制了植物细胞固定化转化系统的进一步应用。随着这些技术的不断发展，固定化细胞技术必将有新的突破，从而获得更为广泛的应用。

10.6.2 植物细胞培养反应器

随着生物工程技术的发展，植物细胞的培养已可在工业规模生化反应器中进行。用于植物细胞培养的核心设备称为植物细胞培养反应器，它与微生物发酵用反应器有许多相同之处，也采用通用式发酵罐、鼓泡式发酵罐、气升式反应器、流化床式反应器、固定床式反应器、膜反应器及振动混合反应器等。植物细胞培养反应器已从实验室规模的 1～30L 放大到工业性试验规模 130～20000L。

对于悬浮培养的植物细胞，当前使用的反应器类型主要有搅拌式（STR）、气升式（air-lift）、鼓泡式（bubble column）、转鼓式（rotating drum）等。STR 是传统的反应器类型。它的溶氧量易通过转速和通气量控制，但搅拌带来的剪切应力对细胞影响很大，因此搅拌器的形式非常影响 STR 的应用。通过降低搅拌速度和改进搅拌子构型可以显著提高 STR 的应用范围，提高细胞及代谢产物的产量。烟草（*N. tabacum*）、葡萄、长春花（*C. roseus*）、三角叶薯蓣（*D. deltoidea*）都已在改进的搅拌式反应器中进行了培养。经过改进的反应器能很好地适合植物细胞的生长，因此对搅拌式反应器的研究有很大的潜力。

鼓泡和气升式反应器提供了低剪切应力环境。鼓泡式反应器是结构最为简单的反应器。气体从底部通过喷嘴或孔盘穿过液池实现气体传递和物质交换。它不含转动部分，整个系统

密闭，易于无菌操作。培养过程中无须机械能消耗，适合于培养对剪切应力敏感的细胞。然而对高密度及黏度较大的培养体系，反应器的混合效率会降低。气升式反应器通过上升液体和下降液体的静压头差实现气流循环，因而比鼓泡型有更均一的流动形式。

气升式反应器搅拌速度和混合程度由下列因素决定：①通气速率，如通入反应器的气体体积；②气体喷射器的位置和构型，如喷嘴和烧结口；③容器的高度与直径比；④升降速率比；⑤培养液的黏度和流变性。循环速度和容器高度有一定关系：$\theta = H^{1.7}$，H 为高度，θ 为混合时间。海巴戟（*M. citrifolia*）、三角叶薯蓣（*D. deltoidea*）、紫草（*L. erythrorhizon*）细胞已用气升式反应器进行了培养。Vienne 和 Morrison 1986 年在气升式反应器中成功地对长春花进行连续培养。气升式反应器给植物细胞的生长和代谢合成提供了适宜的环境，因此已被广泛用于工业化生产。

转鼓式反应器（FDR）是一种较新型的反应器，已用于长春花、紫草的培养。因为转子的转动促进了液体中溶解的气体与营养物质的混合，因此 FDR 具有悬浮系统均一、低剪切环境、防止细胞黏附在壁上的优点，适合于高密度植物悬浮细胞的培养（大于 $20g \cdot L^{-1}$ CDW）。

对于固定化培养的细胞，根据载体的不同，可将反应器类型主要分为胶粒固定反应器（gel-entrapped cell reactor）和膜反应器（membrane reactor）。研究人员 1983 年用气升式系统进行 β-甲基毛地黄毒苷（β-methyldigitoxin）到 β-甲基洋地黄毒苷（β-methyldigoxin）的转化培养，采用海藻钙固定细胞，成功地用 30L 和 200L 的反应器生产地高辛（digoxin）。在膜反应器中，中空纤维膜是另一种可供细胞固定化的载体。由于细胞并不黏附在膜上，因此更好控制压降和流体压力，不受操作规模的限制。Shuler 首次报道用膜反应器系统培养植物细胞。复合膜反应器也被用于植物细胞的培养，其优点是目的代谢产物可以有选择地同反应介质分离。用一种搅拌膜反应器培养 *Thalictrum rugosum*，在不通空气情况下，氧分压可在 $36g \cdot L^{-1}$CDW 的高细胞密度下维持在 30%。

选择理想的生物反应器要考虑许多因素，如氧传输、混合性能和剪切应力强度。增强反应器的混合性能，如增加通气和转速，可以促进物质在反应器内传输，但由于较强的剪切应力对植物细胞产生伤害。因此反应器的设计和改进应综合考虑这几方面的因素，力求在降低系统的剪切环境的同时，使反应器的混合性能良好。在低流体压力下有效的氧传质是选择反应器的一个标准。此外，环境条件的有效控制和易实现工业化等也很重要。

对反应器的改进包括改变气体交换器构型、搅拌器构型、挡板的位置与数目甚至反应容器的构型（外环式、底部倾斜式），以降低剪切应力，实现均匀混合，促进物质交换。植物细胞培养用反应器的选型和开发应综合考虑以下因素：①供氧能力和气泡在液体中的分散程度；②反应器内流变液体的压力强度及其对植物细胞系统的影响；③高细胞浓度混合的均匀性；④控制温度、pH、营养物浓度的能力；⑤控制细胞聚集体的能力；⑥放大的难易程度；⑦长时间维持无菌状态的能力。不同反应器具有不同的特点，不同植物细胞的氧需求、剪切应力敏感性、培养液流体性能和细胞聚集体大小是有差别的，因而要根据植物细胞特性选择其生长及代谢产物合成的反应器。

10.6.3　植物细胞培养规模的放大

早在 20 世纪 30 年代，人们已能在人工培养条件下长期地保持某些植物体中分离出来的细胞的生命力，并能够保持合成其某些代谢产物的能力。至今，用大规模发酵的方法来生产

人参皂苷、紫草宁等自然药物以及烟草代用品已取得突破。但在多年的植物细胞培养技术的发展及应用过程中，生产效率低这一特点严重地限制了植物细胞大规模培养技术的应用，这也是由植物细胞结构特性及培养特性所决定的。植物细胞大规模培养首先必须解决的就是剪切应力的问题。植物细胞个体大、细胞壁僵硬、具有大的液泡的特性决定了植物细胞对剪切应力非常敏感；其次，植物细胞在培养过程中容易聚集成团，从而影响了营养物质及氧气的传递，进而引起植物细胞的生长减缓和代谢产物降低。只有当植物细胞培养的生产效率比植物生产效率高得多或细胞培养产物的质量比植物的产品好时，植物细胞培养工艺的应用及放大才有市场。在奠定了坚实的经济基础之后，大规模植物细胞培养的开发才是合理的。

在生物反应器中进行植物细胞培养以生产次生代谢产物的方法可用于多种细胞体系，常与大规模生产相关的 3 种不同细胞体系是悬浮培养、固定化培养和毛状根培养。这些细胞体系涉及的因素包括最大细胞浓度、生物反应器体积、规模放大潜力、质量传递、过程变量控制和数学模型。不同的培养体系有不同的规模效应。细胞培养规模的扩大并不是实验室培养条件的简单放大，原料的选择、反应器的设计、细胞在不同规模培养体系中的生长及代谢、过程控制、产物分离等均是需要考虑的问题。

10.7 植物细胞培养技术的应用

植物不仅为人类的生存和发展提供必要的食物、纤维和建筑材料，同时其次生代谢产生的萜类、生物碱和酚类等天然成分被人类广泛利用，制成药品、食品添加剂、风味物质、香料、色素、化妆品、生物杀虫剂和农业化肥等。人类已知的 30000 种天然产物 80% 来源于植物，已知化学结构的植物源次生代谢产物数量是微生物源的 4 倍。有些药品只能来源于植物体，且售价不菲，如抗心肌炎药物辅酶、抗癌药物紫杉醇、抗肿瘤药物喜树碱、抗心脑血管药长春新碱等。直到今天，全世界有 121 种临床使用的处方药来源于植物，大约有 75% 的世界人口要依赖传统的植物药剂。这些物质安全、高效、无污染且不易被化学方法合成，在人们的日常生活及各种行业中正扮演着越来越重要的角色。因此，植物天然产物的开发一直是人们研究的热点。然而这些物质在植物体内一般含量很少，直接从植物中提取不但占用大片的耕地，而且还可能造成一些珍贵的植物种类的灭绝，例如，为了获得抗癌药物紫杉醇，原始的做法是从红豆杉的树皮中提取。红豆杉生长缓慢，提取 1kg 紫杉醇需要 1000 棵生长了 100 年的红豆杉 。按照这种提取方法，红豆杉很快就会从地球上消失。面对世界人口急剧增长和人类生存环境极度恶化的现实，如何让有限的土地资源、植物资源发挥更大的作用，以满足人们对食品及其他功能性物质的需求，成为当今科学工作者需要解决的课题。利用植物细胞培养技术来生产或转化合成植物天然成分正是为了解决生态危机，该技术是为了满足人们对植物产品的需求而发展起来的。

10.7.1 食品添加剂相关产品

1. 香兰素 据统计，天然香兰素产品年需求量很大，工业生产年需 30t 以上。美国已经开始采用植物愈伤组织培养技术生产，生产成本比化学合成每千克低 20 美元。它是通过建立细胞悬浮培养物以及采取吸附剂来促进产量的提高，这样培养 40 ~ 47d 后，产量近 16 ~ 18mg · L^{-1}。通过用阿魏酸作为前体物质对香荚兰愈伤组织合成香兰素的研究发现，不是阿魏酸而是肉桂酸作为前体物质转化合成香兰素。实验结果还表明，香兰素的生物合成并不像

文献中说的那样按单一的直线式合成途径，而是按复杂的合成途径进行的。

2. 薄荷油　目前已经开始采用胡椒薄荷细胞培养技术生产工业薄荷油，但产量很低，这主要是因为萜烯单体的不稳定性及植物毒素的毒性作用影响了薄荷油的合成。如今，胡椒薄荷中萜烯单体的合成途径已经基本确定。此外，研究经根癌农杆菌 T37 转化后的薄荷顶芽培养物，发现薄荷油物质的生物合成与萜烯类物质有关，已测出萜烯类物质是由叶部的油腺所分泌的。这些发现必将促进工业薄荷油的生产。

3. 花青素　它广泛存在于各种植物物种中，主要集中于花及果实部分，呈现粉红、红、紫及蓝色，用作食品添加剂可获得诱人的自然的红色。随着国际社会对健康的重视，很多合成色素因使用安全问题被禁用，低毒性的天然花青素就有着巨大的应用潜力。用选择高产细胞团的方法，在 MS 培养基上挑选出繁殖快的高产花青素葡萄细胞系，在 30L 的小型发酵罐中培养，粗花青素产率达到 0.3%；在光照条件下悬浮培养花青素的土当归细胞，在 500L 发酵罐中培养 16d 收获细胞，细胞质量增加 26 倍，花青素产量增加 5 倍，占细胞干重的 17.2%。随着研究工作的进一步深入，植物细胞培养花青素将进入工业化阶段。目前已有报道的能生产花青素的植物有：大戟属（*Euphorbia milli*）、翠菊属（*Callist pephus chinensis*）、甜生豆、矢车菊属（*Cemntaurea cyanus*）、玫瑰花、紫菊属（*Perilla frutescens*）、苹果、葡萄、胡萝卜、野生胡萝卜、葡萄藤、土当归、商陆（*Phytolaca americana*）、筋骨草属（*Ajuga reptans*）、靶苔属等。同时也报道了植物细胞培养生产花青素的代谢途径、高产细胞株的选育、最佳培养基的成分、细胞生长时期与花青素积累的关系、产物的提取等的研究工作。报道过的能用植物细胞培养生产的色素还有胡萝卜素、叶黄素、单黄酮等。

10.7.2　利用植物细胞培养进行植物无性系快速繁殖

与器官发生途径相比，通过悬浮培养植物细胞进行快速无性系繁殖是一个有前途的开发途径。这种方法所用植物材料少，劳动强度低，有比较潜在的经济效益。目前已有一些科技工作者从工程角度开始研究，如 1981 年报道了用发酵罐进行矮牵牛体细胞悬浮培养。1990 年，研究人员对胡萝卜体细胞胚的发生进行了研究，描述了底物的利用、培养过程增殖和再生的动力学模型。现在培养的规模已经达到了 1000L，培养的时间随培养物的不同而不同，1～6 个月不等。目前使用的发酵罐有旋转鼓风式、旋转过滤器式、空气吹动式、气泡柱式、气升式、气相式、氧透膜通气式、交叉通气式等。在 500L 发酵罐中对 *Stevia rebaudiana* 的茎进行悬浮培养，在 25℃、2000Lx 光照、15L · min^{-1} 通气量的培养条件下，每批可再生植株 20 万株。为了使发酵罐里悬浮培养的体细胞胚胎处于相同的发育时期，不断筛选和进行密度梯度离心以及优化培养条件解决了胡萝卜体细胞胚同步发育的难题，实现了从单细胞到再生完整植株的同步化。相信用悬浮细胞进行植物无性系的快速繁殖一定会得到更广泛的应用，带来更大的社会效益和经济效益。

10.7.3　在药物生产方面的应用

植物细胞培养技术在合成及转化生产医药品方面具有重要的应用价值。20 世纪 70 年代后，利用植物细胞培养生产一些药用有效成分已经在工业上获得了成功。据 80 年代末期的统计表明，当时全世界有 40 多种资源植物的次生代谢细胞工程的研究获得成功，悬浮培养体系中次生代谢物质的产量达到或超过整株植物的产量，研究达到中试水平。其中培养紫草细胞生产紫草宁的成功比较令人瞩目，1984 年日本的 Mitsui 石化公司利用紫草的细胞培养

生产紫草宁，规模达到750L，产物最终浓度达到1400mg · L^{-1}。

20世纪90年代至今，利用植物细胞工程进行天然产物的生产进入了一个新的发展阶段，它与基因工程、快速繁殖形成了3大主流。20世纪90年代，全世界已经对1000多种植物进行过细胞培养方面的研究。利用植物细胞培养生产的药用成分有紫杉醇、紫草宁、人参皂苷等一系列的天然植物次生代谢物质。

1. 抗癌药物——紫杉醇 它是用于治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌的高效、低毒、广谱而且作用机制独特的抗癌药物。日本从短叶红豆杉和东北红豆杉中进行愈伤组织诱导、筛选，得到的细胞培养4周增殖5倍，紫杉醇含量达到0.05%，是红豆杉树皮的10倍。筛选得到的细胞株，经悬浮培养后，细胞紫杉醇含量达到20mg · L^{-1}。在5L反应器中培养，细胞接种量为33.3%，经过10d培养，细胞干、湿重均可以增加4倍，在第9天时，紫杉醇含量最高可达到1.8μg · g^{-1}。中国科学院昆明植物所经过多年研究，对多种红豆杉的不同外植体进行愈伤组织的诱导、培养，筛选出了紫杉醇高产细胞株，并经10L反应器扩大培养，细胞生长和紫杉醇含量与摇瓶培养结果大致相同。

2. 疗伤药物——紫草宁 它可以用作创伤、烧伤以及痔疮的治疗药物。1974年，研究人员研制设计出可使培养细胞产生紫草宁衍生物的培养基配方。1981年进行悬浮培养，并得到紫草宁衍生物。日本在1983年也用大规模紫草细胞培养来生产紫草宁。国内南京大学生物系从1986年开始研究，得出在适当的培养条件下，培养的紫草细胞悬浮物中紫草宁含量占干重的14%，比紫草根中含量高几倍。

3. 保健药品——人参皂苷 人参是用于治疗和保健的药材，主要成分是人参皂苷。1964年国内研究人员首先进行了人参组织培养，随后日本、前苏联、联邦德国、美国等研究人员发表有关文章。日本于1986年开始用13L培养罐悬浮培养人参细胞，从中提取人参皂苷。众多研究结果表明，悬浮培养人参细胞能够高产量地生产人参皂苷。

4. 其他 除以上几种已经大规模工业化培养的细胞及生产的医药品外，利用植物细胞培养技术生产植物有效成分的报道还有很多，如毛地黄毒苷、长春碱、长春新碱、苯乙醇苷类、黄酮类、多糖类、红景天苷等。

10.7.4 利用植物细胞生物转化

利用生物体系产生的酶对外源化合物进行的酶催化反应，有机化合物的官能团被酶重新修饰，这些酶的催化作用具有立体性和区域专一性，包括催化还原反应、氧化反应、羟基化、乙酰化、酯化反应、糖基化反应、同分异构化、甲基化、脱甲基化、环氧化反应等的各种酶，相应的原料被转化成化学性质不同且使用价值更高的化合物。

到目前为止，国内外有一些生物转化规模化的例子，但总体较少。如在食品领域，在固定化葡萄糖异构酶的作用下规模化生产高果糖玉米糖浆；在制药行业，第一个利用生物转化技术规模化生产的物质是在被固定化的青霉素酰基转移酶的作用下生产青霉素；另外还有甲基毛地黄毒苷的12β-羟基化转化为甲基地高辛，它是在20L或300L的细胞悬浮培养体系实现的，研究结果显示在20 L的气升式反应器中葡萄糖含量达到8%时基质中地高辛的转化率达到80%；此外还有桔梗细胞悬浮培养体系对斑螯素（catharidin）的生物转化研究，原先不良反应较大的该物质被转化为无不良反应的一对差向异构体1β-羟基斑螯素（Ⅱa）和1α-羟基斑螯素（Ⅱb）。

10.7.5　其他

利用植物细胞培养技术除在以上领域有一定的应用外，在生产生物农药，如鱼藤酮、花椒毒素、噻吩、吲哚素等也有应用。另外，利用植物细胞培养还能够生产植物初生代谢产物，尤其是结合基因工程技术生产有治疗价值的蛋白质，如单克隆抗体、过敏性蛋白质、人血清白蛋白、干扰素、血管紧缩素等产品，应用非常广泛。

10.7.6　植物细胞培养技术应用前景

在植物细胞培养技术发展及应用的几十年中，人们试图在利用该项技术生产有价值的产品过程中降低生产成本、增加产品的产量，提高植物细胞的生长速度和次生代谢产物的产量，使其实现工业化生产。近年来，提高植物细胞培养技术生产次生代谢产物的技术方法主要有选择高产细胞系，控制培养过程中的物理因素（如光照、pH 、通气状况、接种量等）、化学因素（培养基种类及激素、添加诱导子、前体物的饲喂、添加抑制剂等）、培养方法、应用基因工程等。

虽然植物细胞大规模培养生产有用次生代谢产物在过去几十年取得了飞速发展，但真正应用于商业化生产的事例不多，就目前的工艺，以少于每千克 1000 美元的生产成本来获得某种次生代谢产物都是困难的，况且许多基础理论和工程技术问题有待于进一步研究。在目前已经研究过的植物中，仅有 1/5 左右种类的培养物中目的产物的含量接近或超过原植物，多数情况下培养细胞合成某些次生代谢产物的能力下降甚至消失。因此充分利用基因工程的手段，筛选高产细胞系，深入研究特定代谢产物的生物合成途径，对培养条件进行优化，研究和开发适合植物细胞培养的生物反应器是解决这些问题的根本途径，也必将推动方兴未艾的植物细胞培养技术在生物工程领域中发挥越来越大的作用。

本章小结

动、植物细胞与微生物细胞在结构组成、培养特性及代谢活动等方面存在极大的差异。生长繁殖速率慢，细胞耐受剪切应力能力弱，营养要求高，环境适应性差等是动、植物细胞培养过程中的典型特点。但是，动、植物细胞“反应器”能够合成许多微生物细胞不能合成的重要的生物制品或细胞次生代谢产物，例如病毒疫苗、淋巴因子及紫杉醇、人参皂苷等，这决定了动、植物细胞有着不可替代的地位。

无论是动物细胞还是植物细胞，在离体条件下的生长、繁殖以及产物的合成等过程都需要经过一系列反应。不同的细胞对其环境条件有不同的需求，这样就形成了千差万别的细胞反应工程。

参考文献

黄任远，胡云龙，陈国广，等. 2003. 大规模动物细胞固定化培养研究进展. 南京工业大学学报，25（2）：104 ~ 107

黄斌，牛红星. 2004. rCHO 细胞无血清适应及悬浮培养. 华东理工大学学报，（1）：38 ~ 42

黄艳，赵德修，李佐虎. 2001. 利用生物反应器培养植物细胞的研究进展（Ⅱ）. 植物学通报，18（6）：665 ~ 671

来大志，付玲. 2003. 用于生产重组蛋白药物的抗凋亡 CHO 宿主细胞株的建立. 生物工程学

报，19（3）：322～326
林福玉，陈昭烈，黄培堂. 2002. 哺乳动物细胞培养生产药用蛋白的关键环节. 生物技术通讯，（1）：62～65
申烨华，耿信笃. 2000. CHO 细胞表达系统研究新进展. 生物工程进展，20（4）：23～25
王永民，陈昭烈. 2007. 动物细胞无血清培养基的研究与设计方法. 中国生物工程杂志，27（1）：110～114
翁少洁，来大志. 2004. 适于无血清贴壁培养的抗凋亡宿主细胞系 CHO_ IVB2 的构建. 生物工程学报，20（5）：745～749
薛莲，孟琴，吕德伟. 2000. 紫草细胞悬浮培养的结构化动力学模型. 化工学报，51（2）：248～252
余阒. 2007. 哺乳动物细胞适应无血清培养的改造. 科技资讯，22：5
俞俊棠，唐孝宣，邬行彦，等. 2003. 新编生物工艺学. 北京：化学工业出版社
元英进，葛志强. 2004. 植物细胞培养工程. 北京：化学工业出版社
张元兴，易小萍，张立，等. 2007. 动物细胞培养工程. 北京：化学工业出版社
张前程，张凤宝，姚康德，等. 2002. 动物细胞培养生物反应器研究进展. 化工进展，21（8）：560～563
Hunt A，Evan G. 2001. Till death us do part. Science，293：1784～1785
Chun Li，Ying－Jin Yuan，Jin-Chuan Wu，et al. 2003. A structured kinetic model for suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by an oligosaccharide from *Fusarium oxysporum*. Biotechnology Letters，25：1335～1343

习　　题

1. 动、植物细胞哪些特点决定了与微生物细胞培养的差异?
2. 简述动、植物细胞工程的地位及主要技术组成。
3. 叙述动、植物细胞工程的应用。
4. 简述细胞坏死与凋亡的区别。
5. 简述动物细胞培养工艺类型。
6. 细胞固定化的制备方法。
7. 简述哺乳动物外源蛋白质表达宿主细胞的改造。
8. 比较动、植物细胞培养基的基本组成的区别。
9. 动物细胞培养基中血清的作用有哪些?
10. 简述细胞培养生物反应器类型。